

Eliane Cristina Zeni

**ESTUDO DA CAPACIDADE DE REPARO CELULAR AOS
DANOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO UVB EM EMBRIÕES
DO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE *Macrobrachium olfersi***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Evelise Maria Nazari

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zeni, Eliane Cristina

Estudo da capacidade de reparo celular aos danos
causados pela radiação UVB em embriões do camarão de água
doce *Macrobrachium olfersi* / Eliane Cristina Zeni ;
orientadora, Evelise Maria Nazari - Florianópolis, SC,
2013.

85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Radiação
ultravioleta. 3. Embrião de crustáceo. 4. Dano ao DNA. 5.
Reparo celular. I. Nazari, Evelise Maria . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III.
Título.

Dedico este trabalho aos meus pais Nei e Fátima, pela paciência e incentivo de sempre. Sem o apoio deles eu não teria conseguido!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças para superar os desafios que encontrei e chegar até aqui.

Aos meus pais Nei e Fátima e minha irmã Neila pelo incentivo, carinho e por acreditar sempre que eu conseguiria. E que mesmo de longe sempre torceram, rezaram por mim! Nunca esquecerei do dia que vocês me trouxeram para Florianópolis e me disseram: Aproveite as oportunidades e estude! Obrigada pela força e reconhecimento. AMO MUITO VOCÊS!

Ao Marcos que sempre estive do meu lado, com apoio e força que sempre precisei, nunca me deixando desamparada nos momentos mais difíceis. Obrigada pela interminável paciência, alegria, palavras de conforto e ânimo e, principalmente, por todo amor dedicado.

A todos os familiares e amigos, pela fé depositada em mim e por acreditarem na minha capacidade e que participaram nesta fase da minha vida. – Tio Olivar, tenho certeza que de onde você estiver você está feliz por essa conquista! Você permanecerá eternamente em nossas lembranças.

À minha orientadora e amiga Evelise Maria Nazari, minha eterna gratidão por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pela paciência, pelos conselhos, por me acalmar inúmeras vezes, muitas delas “pegando pela mão” para que eu não viesse a chorar! Muito obrigada pela confiança e auxílio essencial durante todo o mestrado e por contribuir tanto para a realização deste trabalho quanto para meu crescimento como pessoa.

Aos professores Yara e Dib por me acolherem e ajudarem. Sem as valiosas dicas e ideias do Dib tudo teria sido mais difícil.

Ao povo do laboratório de reprodução e desenvolvimento animal, onde passei boa parte dos meus dias estudando e trabalhando. Obrigada às pessoas que nele se encontram, por me receber com carinho e me apoiarem! Obrigada Fabi, Karol, Val, Neide, Cláudia, Heloísa, Manu, Lú, Thaline, Gui, Bruna, Vera, Luiza, Christian!

A minha amiga Heloísa que sempre me ajudou com os aquários, citometrias e pela empolgação com as coletas de final de semana. Obrigada!

Ao meu “irmãozinho” Gilian que sempre estive do meu lado me ajudando e por ter encarado tantas coisas junto comigo do início ao fim desta dissertação.

À minha amiga Fabi, por aguentar meus desabafos e pelos conselhos.

Aos técnicos dos LAMEB's pela ajuda indispensável.

Ao povo da “Bioquímica” pelos empréstimos dos equipamentos, principalmente da centrífuga. Obrigada!

As agências de fomento CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

“Nosso único patrimônio que realmente faz diferença é o conhecimento.”
(Peter Drucker)

RESUMO

O aumento da radiação UVB que atinge a superfície terrestre está associado à redução da camada de ozônio. A radiação UVB pode penetrar em ambientes aquáticos e atingir adultos, larvas e embriões que nele habitam. *Macrobrachium olfersi* é um camarão de água doce que vive e se reproduz em águas rasas e transparentes, e seus ovos estão expostos à radiação durante os estágios do desenvolvimento. O objetivo deste estudo foi investigar se a radiação UVB induz danos no DNA e compromete o ciclo celular em embriões de *M. olfersi*. Assim, foi simulada a irradiação UVB (310 mW/cm^2) recebida pelos embriões durante a época de reprodução. Embriões em estágio pós-naupliar inicial (E5) foram irradiados com lâmpada UVB 6W por 30 minutos. Após, os embriões foram mantidos por: (i) uma hora no escuro, (ii) dois dias sob fotoperíodo natural ou (iii) dois dias no escuro. Embriões não irradiados foram utilizados como controle. Danos no DNA, especificamente dímeros de pirimidina, foram observados uma hora após a irradiação, os quais foram similares aos embriões do grupo irradiado-escuro. No entanto, os embriões irradiados que foram mantidos em fotoperíodo natural tiveram diminuição significativa dos dímeros de pirimidina. Além disso, foi observada a diminuição da proliferação de células embrionárias nos grupos irradiados. Não foi observada superexpressão das proteínas p21 e p53. Embriões irradiados com UVB mostraram superexpressão do antígeno PCNA. Observou-se também que nos embriões irradiados aumentou a ocorrência da apoptose. Este estudo mostrou que a UVB altera a proliferação celular em embriões, que pode comprometer os eventos de morfogênese e organogênese. No entanto, os resultados indicam que os embriões *M. olfersi* foram capazes de reparar danos no DNA quando mantidos em condição de luz visível.

Palavras-chave: radiação ultravioleta; embrião; proliferação; dímeros de pirimidina; reparo; *Macrobrachium olfersi*.

ABSTRACT

The increase of UVB radiation that reaches the Earth surface of the is associated with the reduction of the ozone layer. UVB radiation can penetrate in clear shallow aquatic environments and therefore compromise adults, larvae and embryos. *Macrobrachium olfersi* is a prawn that lives and reproduces in transparent shallow Waters, and their eggs are exposed to radiation during developmental stages. The aim of this study was to investigate whether UVB radiation induces DNA damage and compromises cell cycle in embryos of *M. olfersi*. Thus, it was simulated the natural UVB irradiance (310 mW/cm^2) that embryos received during the breeding season. Embryos at early post-naupliar stage (E5) were irradiated using a UVB lamp 6W for 30 minutes. After, the embryos were kept for: (i) one hour in the dark, (ii) two days under natural photoperiod or (iii) two days in the dark. Non-irradiated embryos were used as controls. DNA damage, specifically pyrimidine dimers, was observed one hour after irradiation, which are similar to embryos of the irradiated dark group. However, irradiated embryos kept in natural photoperiod had a significant decrease of pyrimidine dimers. In addition, was observed a decrease of proliferation of embryonic cells in the irradiated groups. No overexpression was observed in p21 and p53 proteins. UVB irradiated embryos the overexpressed the antigen PCNA. It was also observed that irradiated embryos showed a increased occurrence of apoptosis. This study indicates that the UVB changes the cell proliferation of embryos, and may compromise the subsequent morphogenesis and organogenesis events. However, the results indicate that *M. olfersi* embryos were able to repair DNA damage, when exposed to visible light.

Keywords: ultraviolet radiation; embryo; proliferation; pyrimidine dimer; repair; *Macrobrachium olfersi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da dinâmica de dissociação e formação da molécula de ozônio..	24
Figura 2. Representação da dissociação de composto CFC e formação de novos compostos químicos mediados pela radiação UV.....	25
Figura 3. Representação da formação de dímeros de pirimidina decorrente da exposição à radiação UVB.	27
Figura 4. Representação esquemática dos tipos de reparo aos danos causados no DNA pela radiação UV.....	29
Figura 5. Características morfológicas externas observadas em <i>M. olfersi</i>.	36
Figura 6. Câmara de irradiação com aquário equipado com lâmpada de UVB.	38
Figura 7. Embriões de <i>M. olfersi</i> em E5 (idade de irradiação, A) e em E7 (idade de análise, B)..	39
Figura 8. Representação da distribuição dos cortes seriados de embriões de <i>M. olfersi</i> nas lâminas submetidas às técnicas de microscopia.....	40
Figura 9. Embriões de <i>M. olfersi</i> em E7, destacando alterações na transparência das células embrionárias após a irradiação com UVB.....	45
Figura 10. Perfil de distribuição celular nas análises por citometria de fluxo das amostras obtidas de embriões de <i>M. olfersi</i> em E7... ..	47
Figura 11. Análise por citometria de fluxo da formação de dímeros de pirimidina em amostras de embriões de <i>M. olfersi</i> em E7.....	48
Figura 12. Imunomarcção para proliferação celular utilizando anticorpo anti-fosfohistona H3 em embriões de <i>M. olfersi</i> em E7... ..	50
Figura 13. Imunomarcção para identificação da expressão da proteína p21 em embriões de <i>M. olfersi</i> em E7.....	52
Figura 14. Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína p21 em amostras de embriões de <i>M. olfersi</i> em E7.....	53

Figura 15. Imunomarcção para identificação da expressão da proteína PCNA em embriões de <i>M. olfersi</i> em E7..	54
Figura 16. Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína PCNA em amostras de embriões de <i>M. olfersi</i> em E7..	55
Figura 17. Imunomarcção para identificação da expressão da proteína p53 em embriões de <i>M. olfersi</i> em E7..	57
Figura 18. Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína p53 em amostras de embriões de <i>M. olfersi</i> em E7..	58
Figura 19. Análise da ocorrência em embriões de <i>M. olfersi</i> em E7 de células apoptóticas marcadas pelo método de TUNEL..	59
Figura 20. Síntese dos efeitos da radiação UVB em embriões de <i>M. olfersi</i>..	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Descrição dos grupos experimentais nos quais foram submetidas as fêmeas ovígeras e consequentemente os ovos de *M. olfersi*. 37

Quadro 2. Lista dos anticorpos primários utilizados para as técnicas de imuno-histoquímica e/ou citometria de fluxo. 41

Quadro 3. Lista dos anticorpos secundários utilizados para as técnicas de imuno-histoquímica e/ou citometria de fluxo. 42

Quadro 4. Relação de marcadores utilizados na citometria de fluxo e parâmetros utilizados para análise dos dados 46

Quadro 5. Relação de marcadores utilizados e quantificação dos dados obtidos. 60

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	área blastoporal
AL	antênulas
NA	apêndices naupliares
AP	apêndices pós-naupliares
AT	antenas
B	blastômeros
BFC	bromofluorocarbonos
BSA	albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CFC	clorofluorocarbonos
DAB	diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
E	dia embrionário
EGTA	ácido tetracético glicol etileno, do inglês <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ERO	espécies reativas de oxigênio
ES	estomodeu
FITC-A	isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC-A	definição para o parâmetro tamanho, do inglês <i>forward scatter</i>
HE	hematoxilina e eosina
M	mandíbula
LO	lobo óptico
NA	densidade numérica de células por área
NER	reparo por excisão de nucleotídeos, do inglês <i>nucleotide excision repair</i>
P.a	população alvo
P A	para análise
PBS	tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PC	papila caudal
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PE	ficoeritrina, do inglês <i>phycoerythrin</i>
PEM-FA	fixador piperazina-1,4-bis ácido 2-etanosulfônico, ácido tetracético glicol etileno, sulfato de magnésio, formaldeído
PER	reparo por fotorreativação, do inglês <i>photoreactivation</i>

PHH3	fosfohistona H3, do inglês <i>phospho histone H3</i>
PIPES	piperazina-1,4-bis ácido 2-etanosulfônico
SSC-A	definição para o parâmetro complexidade, do inglês <i>side scatter</i>
TBS	tampão Tris salino, do inglês <i>Tris-buffered saline</i>
TUNEL	terminal tansferase dUTP nick end labeling, do inglês <i>transferase terminal dUTP nick end labeling</i>
UV	ultravioleta
UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
UVC	ultravioleta C
V	vitelo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	23
1.2 OS EFEITOS DA RADIAÇÃO UVB NOS ORGANISMOS AQUÁTICOS	26
1.3 REPARO CELULAR	28
1.4 MODELO BIOLÓGICO DE ESTUDO	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 GERAL	33
2.2 ESPECÍFICOS.....	33
3 METODOLOGIA.....	35
3.1 COLETA DOS EXEMPLARES.....	35
3.2 ESTAGIAMENTO DOS OVOS	35
3.3 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
3.4 PROCEDIMENTOS DE IRRADIAÇÃO.....	38
3.5 ESTAGIAMENTO DOS EMBRIÕES	38
3.6 ANÁLISES MICROMORFOLÓGICAS DOS EMBRIÕES.....	39
3.6.1 Fixação e inclusão dos ovos	39
3.6.2 Marcações celulares por imuno-histoquímica	40
3.6.3 Identificação de células apoptóticas pelo método de TUNEL.....	42
3.7 ANÁLISES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO	43
3.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS RESULTADOS	43
4 RESULTADOS	45
4.1 ANÁLISE DA MORFOLOGIA EXTERNA DOS EMBRIÕES <i>IN VIVO</i>	45
4.2 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE DÍMEROS DE PIRIMIDINA	46
4.3 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	49
4.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR	51
4.5 ANÁLISE DA MORTE CELULAR	56
5 DISCUSSÃO	62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE A – PADRONIZAÇÃO DA FIXAÇÃO DOS OVOS ..	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

A radiação ultravioleta (UV) é classificada de acordo com seus efeitos fotobiológicos e comprimento de onda em: ultravioleta-A (UVA-I, 400 - 340nm; UVA-II, 340 - 315nm), ultravioleta-B (UVB, 315 - 280nm) e ultravioleta-C (UVC, 280 - 100nm) (DIFFEY, 1980, 1991, 2002). Dentre os efeitos da radiação UV, destacam-se os de importância biológica para diversos processos naturais. A radiação UVA fornece energia luminosa para a fotossíntese e atua na ativação da enzima fotoliase, envolvida em mecanismos de fotoreparo celular (PAUL; GWYNN-JONES, 2003; DONG et al., 2007; HÄDER et al., 2007); a radiação UVB contribui para a orientação visual de espécies de aves, peixes e de artrópodes (LAND; NILSSON, 2002), sendo necessária também para a síntese de vitamina D3 em humanos (WEBB; HOLICK, 1988; BANDEIRA et al., 2006; GODAR et al., 2012; DIFFEY, 2013).

Além dos efeitos benéficos aos ecossistemas e organismos, a radiação UV pode desencadear reações adversas, dependendo da dose recebida. A radiação UVA pode causar queimaduras de pele (eritema), envelhecimento precoce e catarata (GALLAGHER; LEE, 2006); a radiação UVB além de causar eritema, pode também causar supressão do sistema imunológico e, principalmente, induzir a danos no DNA, que levam ao câncer de pele (CADET et al., 2005; BERTAGNOLLI et al., 2007; MAHMOUD et al., 2008; MONTAGNER; COSTA, 2009; BEHRENDT et al., 2010; NASSER, 2010; DUPONT et al., 2013); já a radiação UVC é conhecida por sua ação esterilizante e mutagênica (KIRCHHOFF et al., 2000).

Na superfície terrestre, a incidência de radiação UV é controlada pela camada de ozônio estratosférico, a qual é composta pelo gás ozônio (O_3) formado por um átomo livre de oxigênio (O) e uma molécula de oxigênio (O_2). Nesta camada ocorre uma dinâmica constante de dissociação e formação do ozônio, que é dependente da energia da radiação UV para a quebra ou restabelecimento das ligações químicas entre O e O_2 (Figura 1) (DIFFEY, 1991, 2002; ROWLAND, 2006).

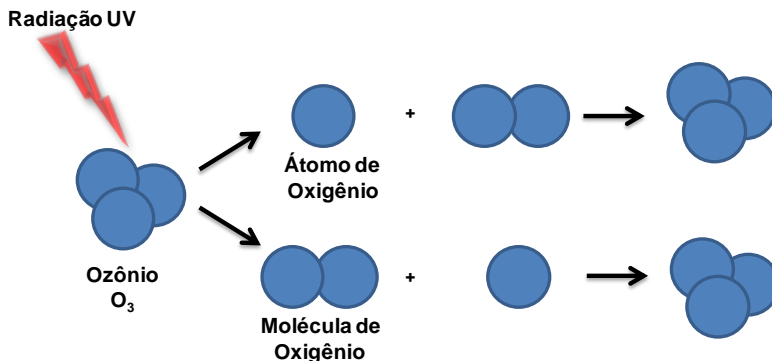


Figura 1. Representação da dinâmica de dissociação e formação da molécula de ozônio. Destaque para as reações fotoquímicas mediadas pela energia da radiação UV. Fonte: Adaptado de Walter (2013).

Por ser a mais energética, a radiação UVC é praticamente toda absorvida na camada de ozônio, pois transfere a sua energia para as reações de dissociação e formação do ozônio, enquanto que a radiação UVA, que possui menos energia, atravessa a camada de ozônio atingindo a superfície terrestre. Parte da energia da radiação UVB que não é utilizada nas reações fotoquímicas de dissociação e formação do ozônio, atravessa a camada de ozônio e também atinge a superfície terrestre (KIRCHHOFF et al., 2000; VERNET, 2006). Desta forma, a camada de ozônio atua no controle da radiação que chega à superfície (KARENTZ, 2008), de modo que a proporção de UVA nos ambientes terrestres é de aproximadamente 90% a 95%, enquanto que a UVB é de 5% a 10% (BROZYNA et al., 2007; D'ORAZIO et al., 2013).

Estudos realizados na década de 1970 demonstraram que compostos bromofluorocarbonos (BFC) e clorofluorocarbonos (CFC) também são dissociados pela radiação UV na estratosfera, liberando, moléculas de bromo, flúor e cloro. Por sua vez, estas moléculas se ligam ao O e O_2 , provenientes das reações fotoquímicas do ozônio, originando novas moléculas, em detrimento da molécula de O_3 (Figura 2), comprometendo assim a formação da camada de ozônio (CRUTZEN, 1974; MOLINA; ROWLAND, 1974). Desde então, tem-se registrado nos últimos 40 anos, uma diminuição do ozônio estratosférico, em decorrência da emissão na atmosfera de CFC e BFC pela ação humana (BRASSEUR et al., 1985; CICERONE, 1987; MAHMOUD et al., 2009; SHANKLIN, 2010; MAIONE et al., 2013).

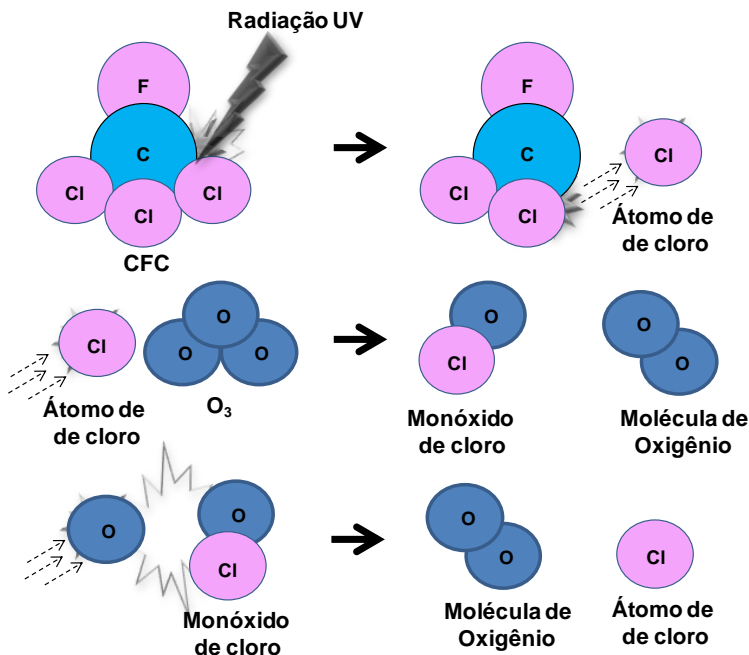


Figura 2. Representação da dissociação de composto CFC e formação de novos compostos químicos mediados pela radiação UV. Destaque para o comprometimento da formação da molécula de ozônio. C, carbono; CFC, clorofluorocarbono; Cl, cloro; F, flúor; O, oxigênio; O₃, ozônio. Fonte: Adaptado de State University of New York (2013).

Além dessas alterações na camada de ozônio, foi descoberta na década de 1980 a existência do chamado buraco de ozônio antártico, o qual foi caracterizado pela significativa redução da camada de ozônio, devido à sua localização geográfica (FARMAN et al., 1985). Isso ocorre porque algumas regiões do planeta apresentam maiores concentrações de compostos químicos, que participam de reações que tornam a camada de ozônio rarefeita (MEADOR et al., 2002). Estudos sobre a redução da camada de ozônio apontam que essa rarefação pode estender-se para latitudes mais baixas, atingindo a região Sul do Brasil (KIRCHHOFF et al., 1996, 2000).

Alterações na camada de ozônio estão associadas ao aumento da intensidade dos comprimentos de onda mais curtos da radiação UVB na superfície terrestre, a qual em níveis elevados torna-se estressante

para a maioria dos organismos (KIRCHHOFF et al., 2000; DAHMS; LEE, 2010). Os estudos sobre os efeitos da radiação UVB mostram que as espécies apresentam sensibilidade diferenciada, o que se reflete em variados padrões de efeitos nocivos induzidos por esta radiação (BANCROFT et al., 2007; CAMPANALE et al., 2011; KIM et al., 2011).

A radiação UVB pode penetrar nos ambientes aquáticos, dependendo da profundidade e da transparência da coluna d'água (HÄDER et al., 1998; 2007; ALTSHULER et al., 2011). Muitos organismos aquáticos amenizam os efeitos da radiação UVB por possuírem cascas ou conchas. Porém, os ovos e as larvas normalmente não disponibilizam desses mecanismos de defesa, ficando assim expostos à radiação (CYWINSKA et al., 2000), já que muitas espécies depositam seus ovos em regiões de águas rasas e claras, onde a radiação pode penetrar com a mesma intensidade que chega à superfície (BANCROFT et al., 2007; DAHMS; LEE, 2010).

1.2 OS EFEITOS DA RADIAÇÃO UVB NOS ORGANISMOS AQUÁTICOS

Nos animais aquáticos vertebrados e invertebrados, a radiação UVB pode comprometer, além dos adultos, os embriões e larvas, alterando o ritmo do desenvolvimento embrionário, diminuindo as taxas de eclosão e de sobrevivência larval (DONG et al., 2007; DAHMS; LEE, 2010; FUKUNISHI et al., 2012; NAZARI et al., 2013).

Dentre os invertebrados aquáticos, destacam-se os trabalhos com ouriços do mar, os quais demonstraram que a radiação UVB induziu o surgimento de alterações morfológicas e fisiológicas em embriões e larvas, além de danos ao DNA e estresse celular (LESSER et al., 2003; NAHON et al., 2009; CAMPANALE et al., 2011). Em moluscos também houve aumento na mortalidade e atraso no desenvolvimento embrionário e larval de gastrópodes de costões rochosos expostos à radiação UVB (PRZESLAWSKI, 2005; PRZESLAWSKI et al., 2005).

Em embriões de camarão de água doce, a radiação induziu o aparecimento de alterações morfológicas e uma diminuição na proliferação celular (NAZARI et al., 2010). Já em estudos realizados com larvas de microcrustáceos, a radiação UVB reduziu a mobilidade e interferiu diretamente no tamanho dos indivíduos tornando-os menores

e, em alguns casos, ocorreu elevada mortalidade (CYWINSKA et al., 2000; MORESINO et al., 2011).

A radiação UVB age diretamente nas células dos organismos expostos. No citoplasma, esta radiação induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que promovem a peroxidação lipídica, responsável por gerar alterações na permeabilidade das membranas celulares (GOUVEIA et al., 2005; FRANCO et al., 2009). No núcleo celular, o principal e mais nocivo dano causado pela radiação UVB é o dano ao DNA, através da formação de dímeros de pirimidina ciclobutano e da formação de 6-4 fotoprodutos (SANCAR, 2003; GROFF et al., 2010; YANG, 2011). Os dímeros de pirimidina (Figura 3) correspondem a cerca de 80-90% dos danos e caracterizam-se pela formação de ligações covalentes entre carbono-carbono de pirimidinas adjacentes, que comprometem os mecanismos de transcrição e replicação (ESSEN; KLAR, 2006). Já os 6-4 fotoprodutos que correspondem a 10-20% dos danos, são formados pela ligação entre o carbono 6 de uma timina e o carbono 4 da timina adjacente (MITCHELL; FERNANDEZ, 2011).

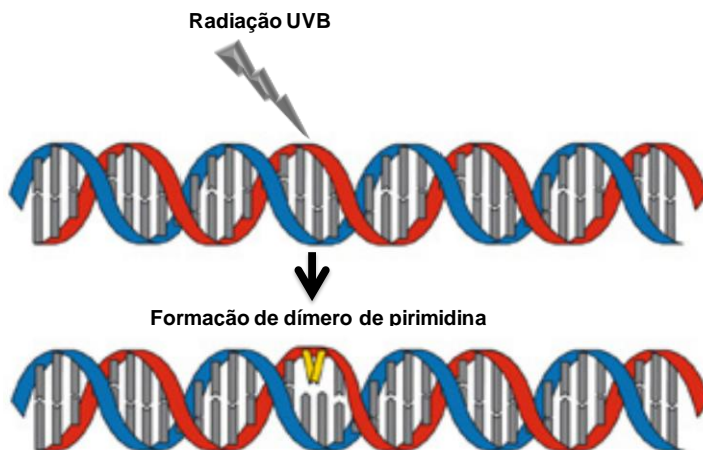


Figura 3. Representação da formação de dímeros de pirimidina decorrente da exposição à radiação UVB. Fonte: Modificado de Lagerwerf et al. (2011).

1.3 REPARO CELULAR

Nos casos de danos ao DNA, são conhecidas diferentes vias de reparo, conforme o agente causador e o tipo de dano causado. Os danos induzidos pela radiação UV são geralmente reparados pelos mecanismos de excisão de nucleotídeos (NER, do inglês, *nucleotide excision repair*) e por fotorreativação (PER, do inglês, *photoreactivation or photoenzymatic repair*) (ISELY et al., 2009; DIDERICH et al., 2011).

O reparo por NER consiste na remoção da parte danificada da fita de DNA a partir do reconhecimento da lesão, por meio das endonucleases, promovendo abertura da dupla hélice e a incisão das extremidades próximas a lesão. Ocorre então a ressíntese da fita pela enzima DNA polimerase e em seguida a excisão da fita antiga pela enzima exonuclease e o reparo do DNA (Figura 4A) (BANASZAK, 2003; VERMEULEN, 2011; LAGERWERF et al., 2011; KIENZLER et al., 2013).

O reparo por PER é catalisado pela enzima fotoliase, uma proteína monomérica constituída de 454 a 614 aminoácidos, contendo dois cromóforos ligados de forma não covalente, e que apresenta alta afinidade pelas regiões do DNA com formação de dímeros de pirimidina (Figura 4B). Este mecanismo de reparo é dependente de luz visível (400- 500 nm) e/ou radiação UVA (315 - 400 nm), para que a fotoliase reverta a estrutura dimérica originada no DNA à sua forma original (THOMA, 1999; FRIEDBERG, 2003; SANCAR, 2003; GROFF et al., 2010).

A função principal da fotoliase é atuar no sistema de reparo do DNA, após o dano causado pela radiação UVB (SANCAR, 1994; THOMPSON; SANCAR, 2002; BLAUSTEIN; BELDEN, 2003; HÄDER; SINHA, 2005; ESSEN; KLAR, 2006; KIENZLER et al., 2013). A ocorrência de reparo celular aos danos no DNA por meio da fotoliase não foi identificada em mamíferos placentários (SINHA; HÄDER, 2002). Contudo, este mecanismo de reparo é observado em algumas espécies de invertebrados, como ouriço do mar e insetos e em espécies de vertebrados, como anfíbios e peixes (TODO et al., 1996; 1997; UCHIDA et al., 1997; YASUI; MCCREADY, 1998; ISELY et al., 2009).

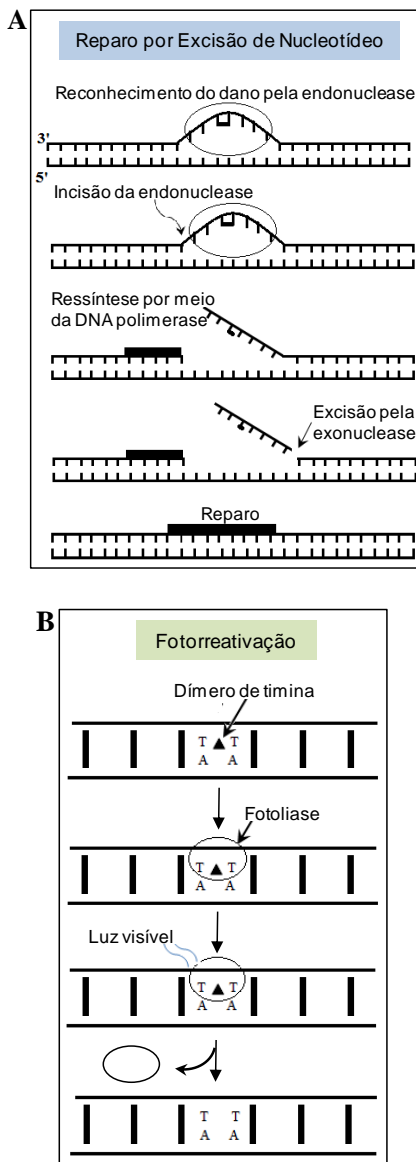


Figura 4. Representação esquemática dos tipos de reparo aos danos causados no DNA pela radiação UV. (A) Reparo por excisão de nucleotídeo. (B) Fotorreparo mediado pela enzima fotoliase. Fonte de (A): Modificado de Banaszak (2003); de (B): Modificado de University of Texas at El Paso (2013).

Os danos ao DNA podem apresentar efeitos imediatos sobre a funcionalidade das células, bem como manifestar consequências a longo prazo. Quando não reparados, esses danos podem induzir alterações permanentes, como acontece no caso das mutações. Além disso, danos ao DNA não reparados podem desencadear outras alterações celulares, como as interferências nos processos de transcrição e replicação. Tais danos podem desencadear cascatas de eventos que levam aos atrasos e à parada no ciclo celular, alterações na diferenciação e indução à apoptose (HÄDER et al., 2003; LO et al., 2005; DAHMS; LEE, 2010; GROFF et al., 2010). Assim, o acúmulo de danos no DNA podem ter efeitos negativos sobre a fisiologia, morfologia e sobrevivência dos organismos (SANCAR, 1996; BOER; HOEIJMAKERS, 2000; DIDERICH et al., 2011).

Inicialmente, os danos no DNA são reconhecidos por proteínas que atuam no sistema de checagem do ciclo celular. Durante esse reconhecimento, ocorre uma parada no ciclo celular e, após o reconhecimento, ou são ativados os sistemas de reparo ou a célula é induzida a apoptose (PIETENPOL; STEWART, 2002). Ao atrasar a progressão do ciclo celular, proporciona-se mais tempo para que ocorra o reparo do DNA (KAUFMANN; PAULES, 1996; PEI; STRAUSS, 2013). A proteína p53 é conhecida por desempenhar um papel chave na progressão do ciclo e na apoptose, após o estresse celular (PIETENPOL; STEWART, 2002). O acúmulo dessa proteína no núcleo da célula inibe o ciclo mitótico no início da fase G1 e ativa a transcrição de genes de reparo do DNA, impedindo desta forma a propagação do erro. Se o processo de reparo ao dano não for eficiente, p53 pode desencadear o processo de apoptose (PEI; STRAUSS, 2013).

A apoptose é responsável durante o desenvolvimento embrionário pela remoção de células, essencial na formação de tecidos e órgãos (KERR et al., 1972; FADEEL; ORRENIUS, 2005; KIM, 2005; SCHLEICH; LAVRIK, 2013). As alterações morfológicas típicas durante a apoptose incluem a degradação de componentes celulares, a fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (HAIL et al., 2006). Diferentes condições celulares podem desencadear a apoptose, como danos no DNA e níveis aumentados de ERO, que por sua vez podem ser induzidos por fatores exógenos, como os agentes quimioterápicos e a radiação UV (KIECHLE; ZHANG, 2002; GRIVICICH et al., 2007; FRANCO et al., 2009; SUZANNE; STELLER, 2013).

1.4 MODELO BIOLÓGICO DE ESTUDO

Em particular, dentre os invertebrados que desenvolvem seus ovos em ambientes de águas claras e rasas estão os camarões de água doce, conhecidos popularmente como pitus, e pertencentes aos gêneros *Macrobrachium*, *Palaemon* e *Palaemonetes* (BUCKUP; BOND-BUCKUP, 1999). Estes gêneros tem ampla distribuição geográfica, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (HOLTHUIS, 1980) e, no Brasil, uma das espécies mais representativas é *Macrobrachium olfersi*, que habita ambientes de pouca profundidade (DUGGER; DOBKIN, 1975; MOSSOLIN; BUENO, 2002; MELO; BROSSI-GARCIA, 2005). Na Ilha de Santa Catarina, *M. olfersi* é a espécie de camarão de água doce mais frequente e é encontrada com certa abundância nas margens rasas da Lagoa do Peri (MÜLLER et al., 1999; AMMAR et al., 2001). *M. olfersi* desempenha importante papel ecológico, pois é detritívoro e participa da cadeia alimentar de peixes e aves aquáticas, atuando também na reciclagem de energia dos ambientes de água doce.

De um modo geral, *M. olfersi* é uma espécie bastante adequada a estudos em laboratório, pois é de fácil captura e apresenta boa adaptabilidade a ambientes artificiais. Além disso, as fêmeas dessa espécie possuem uma câmara incubadora externa onde alojam seus ovos até a eclosão. Durante a incubação dos ovos as fêmeas são denominadas fêmeas ovígeras. (MÜLLER; PRAZERES, 1992; NAZARI et al., 2003).

O desenvolvimento embrionário de *M. olfersi*, em condições de temperatura de 24°C (± 1) tem duração de 14 dias (SIMÕES-COSTA et al., 2005). Os ovos desta espécie são ricos em vitelo, o que determina a clivagem meroblástica superficial. Neste modelo, de clivagem, as células embrionárias arranjam-se na periferia do ovo, mantendo essa posição nos estágios subsequentes, permitindo assim a visualização direta das mudanças morfológicas no embrião ao longo dos estágios do desenvolvimento (MÜLLER et al., 2003; SIMÕES-COSTA et al., 2005).

Estudos realizados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal BEG/UFSC demonstraram pela primeira vez em embriões de *M. olfersi*, que a radiação UVB provoca danos celulares (NAZARI et al., 2010, 2013). Contudo, os mecanismos de reparo celular aos danos causados pela radiação UVB nesta espécie permanecem desconhecidos. Embora nas últimas décadas tenham se intensificado os estudos sobre os efeitos da radiação UVB, ainda são escassos na

literatura os estudos que abordam especificamente os efeitos destas radiações em embriões de espécies aquáticas. Além disso, os trabalhos enfocam principalmente os danos da radiação UVB sobre a mortalidade e taxa de eclosão dos embriões, sendo poucas as informações sobre os mecanismos celulares comprometidos pela radiação UV.

Considerando que as espécies apresentam sensibilidade diferenciada à radiação UV, faz-se necessário ampliar o número de espécies aquáticas investigadas, uma vez que os estudos são realizados principalmente com equinodermas, peixes e anfíbios. Acrescenta-se ainda o fato destes estudos serem realizados com larvas, juvenis e adultos. Desta forma, pouco se conhece a respeito dos efeitos da radiação UVB sobre os mecanismos celulares inerentes ao desenvolvimento embrionário. Sendo assim, a hipótese apresentada neste trabalho é a de que a radiação UVB altere a estrutura do DNA, induzindo a formação de dímeros de pirimidina e por consequência interfira no ciclo celular dos embriões de camarão de água doce da espécie *M. olfersi*. Além disso, será verificada a possibilidade de reparo aos danos no DNA em condições de luz visível e de escuro durante o desenvolvimento destes embriões.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar os efeitos da radiação UVB sobre as células embrionárias de camarão de água doce da espécie *M. olfersi*, especificamente sobre a ocorrência de danos ao DNA e sua interferência no ciclo celular. Propõe-se ainda investigar, em condições de luz visível e de escuro, se os embriões apresentam mecanismos de reparo celular aos danos induzidos pela radiação UVB.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar as características morfológicas externas dos embriões de *M. olfersi* irradiados com UVB e submetidos às condições de luz visível e escuro;
- Verificar a ocorrência de danos nucleares induzidos pela radiação UVB através da formação de dímeros de pirimidina e da expressão de proteínas de checagem do ciclo celular;
- Avaliar se a radiação UVB interfere no processo de proliferação celular durante a morfogênese e organogênese inicial;
- Investigar se ocorre reparo aos danos nas células de embriões de *M. olfersi* mantidos em condição de luz visível ou de escuro, após a irradiação com UVB.

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA DOS EXEMPLARES

Exemplares adultos dos camarões de água doce *M. olfersi* foram coletados no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, Brasil e transportados em aquários portáteis para o laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal CCB/UFSC. A aclimação foi realizada por um período de 7 dias, em aquários de 60 L com aeração constante, em condição de fotoperíodo natural, temperatura de 24°C (± 1). Diariamente os camarões foram alimentados com ração para organismos aquáticos (Alcon Bottom Fish®). Após o período de aclimação, os camarões foram mantidos na proporção de 1 macho : 3 fêmeas, para viabilizar a realização de cópula e a obtenção de fêmeas ovígeras. Os procedimentos de coleta e manutenção dos camarões em laboratório de pesquisa, adotados neste trabalho, foram aprovados pelo IBAMA (Autorização Permanente nº 15294-1/2008), além do que, todo esforço foi feito para minimizar o desconforto dos animais.

3.2 ESTAGIAMENTO DOS OVOS

Amostras de ovos ($n \cong 10$ ovos/fêmea/grupo) foram utilizadas para o reconhecimento das características morfológicas externas dos embriões e para o estagiamento dos mesmos ao estereomicroscópio (Olympus SHZ 10, 35 a 70X) (SIMÕES-COSTA et al., 2005). Neste trabalho foi adotado o estagiamento por dia embrionário (E), que corresponde a cada intervalo de 24 horas de desenvolvimento. Para tal, foram consideradas como características morfológicas externas conforme Figura 5.

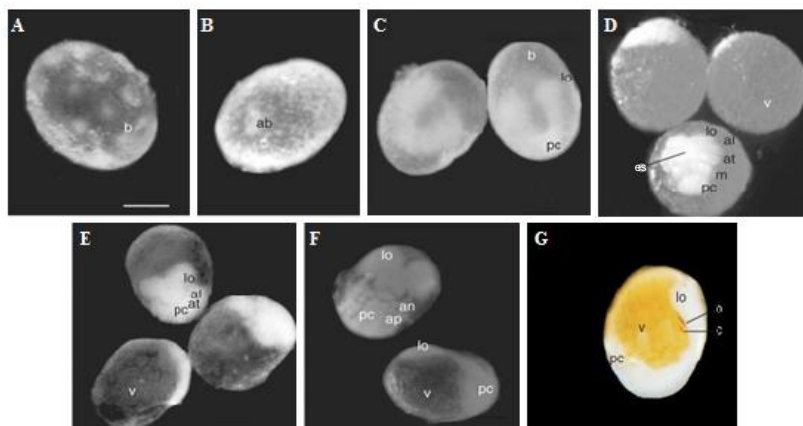


Figura 5. Características morfológicas externas observadas em *M. olfersi*. Presença dos blastômeros (A), organização da área blastoporal (B), organização do disco germinativo (C), formação dos lobos ópticos, das antênulas, antenas e mandíbulas presentes no nauplius (D) e no pós-nauplius embrionizados (E, F e G). Área blastoporal (ab), antênulas (al), apêndices naupliares (an), apêndices pós-naupliares (ap), antenas (at), blastômeros (b), estomodeu (es), lobo óptico (lo), mandíbula (m), papila caudal (pc), vitelo (v). Barra de escala = 0,1 mm. Fonte: Modificado de SIMÕES-COSTA et al. (2005).

3.3 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a composição dos grupos experimentais, foram selecionadas fêmeas ovígeras com ovos em E5, que correspondem a embriões em processos iniciais de morfogênese e organogênese (MÜLLER et al., 2003). As fêmeas ovígeras foram divididas em quatro grupos, descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos grupos experimentais nos quais foram submetidas as fêmeas ovígeras e consequentemente os ovos de *M. olfersi*.

Grupo	Dia embrionário		Irradiação	Condições pós-irradiação	Objetivo da condição experimental
	Irradiação	Análise			
Controle-claro (n = 20 fêmeas)	E5	E7	Não irradiada	Permanência por 2 dias em fotoperíodo natural	Controle em condição de fotoperíodo natural*
Controle-escuro (n = 18 fêmeas)				Permanência por 2 dias no escuro	Controle na ausência da luz visível
Irradiado-claro (n = 15 fêmeas)	E5	E7	UVB 30 minutos	Permanência por 2 dias em fotoperíodo natural	Verificar a ocorrência de danos promovidos pela irradiação; e/ou fotorreparo celular em condição de fotoperíodo natural*
Irradiado-escuro (n = 15 fêmeas)				Permanência por 2 dias no escuro	Verificar a ocorrência de danos promovidos pela irradiação; e/ou reparo celular na ausência de luz visível
Irradiado-imediato (n = 6 fêmeas)	E5 - E7		UVB 30 minutos	1 hora no escuro	Verificar a formação de dímeros logo após irradiação

*A condição de fotoperíodo natural corresponde a exposição dos aquários (transparentes) a luminosidade natural do dia.

3.4 PROCEDIMENTOS DE IRRADIAÇÃO

As fêmeas foram transferidas para aquário de 30 L equipado com lâmpada UVB de 6 W de potência (Vilber Lourmat) e com fundo desprovido de abrigo (Figura 6).

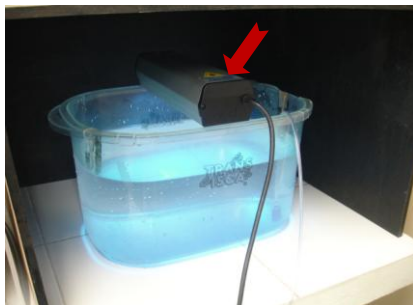


Figura 6. Câmara de irradiação com aquário equipado com lâmpada de UVB (seta).

O período de exposição à radiação (30 minutos) foi baseado no trabalho de Miguel et al. (2002), que utilizou como modelo animal caranguejos adultos da espécie *Ucides cordatus*. A incidência da radiação no fundo do aquário foi medida com radiômetro International Light IL1400A, sendo a irradiância obtida de 310 mW/cm^2 . A irradiância de UVB utilizada em laboratório simulou, de acordo com Nazari et al. (2010), a irradiância natural a qual às fêmeas estão expostas durante a estação reprodutiva de *M. olfersi* na Ilha de Santa Catarina, que corresponde aos meses de verão (MÜLLER et al., 1999; AMMAR et al., 2001). Os efeitos da radiação UVB foram investigados nos embriões provenientes de cada grupo experimental, através de análises macromorfológicas dos embriões ao estereomicroscópio e de análises micromorfológicas em microscopia de luz, bem como através de análises em citometria de fluxo.

3.5 ESTAGIAMENTO DOS EMBRIÕES

Decorrido o período pós-irradiação, realizou-se novo estagiamento dos embriões, ($n \cong 10$ ovos/fêmea/grupo) de acordo com o

item 3.2 para verificar se o estágio embrionário esperado para o dia da análise correspondia ao estágio efetivamente observado (Figura 7).

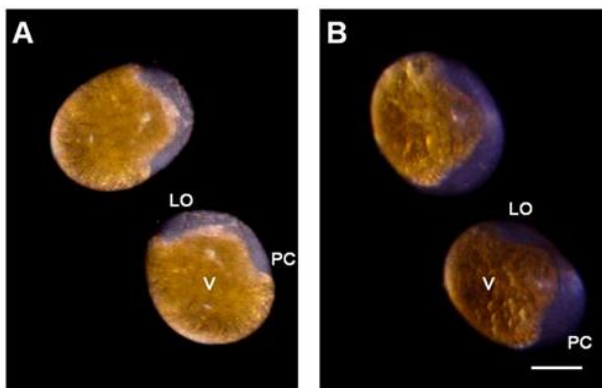


Figura 7. Embriões de *M. olfersi* em E5 (idade de irradiação, A) e em E7 (idade de análise, B). LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Barra de escala = 0,1 mm.

3.6 ANÁLISES MICROMORFOLÓGICAS DOS EMBRIÕES

Diferentes técnicas de fixação foram testadas neste trabalho (Apêndice 1), sendo descrita abaixo a mais adequada para a preservação da integridade dos tecidos embrionários.

3.6.1 Fixação e inclusão dos ovos

Os ovos em E7 foram fixados em solução PEM-FA (pH 6,9) (tampão PIPES 0,1M + EGTA 2,0 mM + MgSO_4 1,0 mM + formaldeído 3,7%) (SCHOLTZ et al., 1994) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, os ovos foram mantidos em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) (Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4 + H_2O destilada) 0,1M, pH 7,4 a 4°C. Em seguida, os ovos foram submetidos a banhos em solução crioprotetora de sacarose a 5% e 15% por 3 horas a 4°C e em solução de sacarose a 30% por 24 horas a 4°C. A inclusão dos ovos foi realizada com meio comercial Tissue Tek® a -25°C e os cortes seriados obtidos em micrótomo criostato Leica CM 1850 UV, na espessura de 6µm. Os cortes foram montados em lâminas tratadas com poli-L-lisina, sendo que em cada lâmina havia cortes dos grupos controles e irradiados (Figura 8), proporcionando as mesmas condições durante a realização das técnicas.

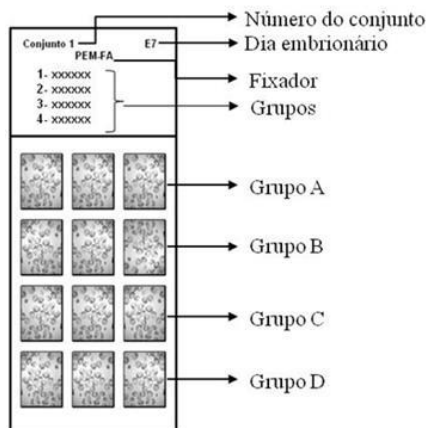


Figura 8. Representação da distribuição dos cortes seriados de embriões de *M. olfersi* nas lâminas submetidas às técnicas de microscopia.

Após a montagem, as lâminas foram mantidas a 4°C para preservação dos cortes. Parte das lâminas foi destinada às análises por imuno-histoquímica e a outra parte para as análises pelo método de TUNEL. Para controle histológico e verificação da integridade dos tecidos e células, realizou-se coloração com Hematoxilina-Eosina (HE).

3.6.2 Marcações celulares por imuno-histoquímica

As lâminas foram lavadas em banhos de água corrente por 3 vezes à temperatura ambiente para a remoção do meio de montagem. Em seguida, os cortes foram tratados com H₂O₂: metanol 100% (1:2) por 10 minutos para a inativação das peroxidases endógenas. Os cortes foram permeabilizados em PBS (NaCl + KCl + Na₂HPO₄ + KH₂PO₄ + H₂O destilada) 0,1M, pH 7,4 + Triton® X-100 a 0,3% por 30 minutos e tratados com soro fetal bovino (BSA, do inglês *bovine fetal serum*) a 5% por 45 minutos para a inativação dos sítios inespecíficos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários (Quadro 2) em câmara úmida à 4°C durante a noite. Após, os cortes foram lavados com PBS + Triton® X-100 a 0,3% e em seguida incubados com anticorpos secundários (Quadro 3) durante 3 horas à temperatura ambiente. Logo após, foram tratados com avidina-peroxidase por 45 minutos. A revelação colorimétrica foi realizada com solução de PBS + DAB® 3,3'diaminobenzidina + H₂O₂, sendo interrompida após 10 minutos com

água destilada. Posteriormente, os cortes foram desidratados em série crescente de etanol e diafanizados em dois banhos em xilol. As lâminas foram montadas com meio Entellan®. Os controles negativos da reação por imuno-histoquímica foram realizados da mesma forma, suprimindo-se apenas a incubação com o anticorpo primário, o qual foi substituído por PBS 0,1 M.

Quadro 2. Lista dos anticorpos primários utilizados para as técnicas de imuno-histoquímica e/ou citometria de fluxo.

Anticorpos	Espécie em que foi desenvolvido	Origem	Objetivo da marcação	Diluição	
				Imuno-histoquímica	Citometria de fluxo
Anti-fosfohistona H3 (policlonal, Upstate)	coelho	humana	Verificar a expressão da proteína histona H3 fosforilada como marcador de mitose	1:400	---
Anti-PCNA (policlonal, Santa Cruz)	coelho	humana	Verificar de expressão do antígeno nuclear de proliferação celular	1:100	1:1000
Anti-p53 (policlonal, Santa Cruz)	coelho	humana	Verificar a expressão da proteína p53 relacionada à checagem de ciclo celular	1:100	1:1000
Anti-p21 (monoclonal, Santa Cruz)	camundongo	humana	Verificar a expressão da p21 como proteína checagem do ciclo celular	1:100	1:1000
Anti-dímeros de timina (monoclonal, Sigma)	camundongo	galinha	Observar a formação de danos específicos no DNA causados pela radiação UVB	---	1:1000

Quadro 3. Lista dos anticorpos secundários utilizados para as técnicas de imuno-histoquímica e/ou citometria de fluxo.

Anticorpos	Espécie em que foi desenvolvido	Diluição	
		Imuno-histoquímica	Citometria de fluxo
Anti-coelho Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes)	cabra	---	1:1000
Anti-camundongo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes)	cabra	---	1:1000
Anti-coelho biotinilado conjugado à peroxidase (Sigma)	cabra	1:200	---
Anti-camundongo biotinilado conjugado à peroxidase (Sigma)	coelho	1:200	---
Anti-coelho conjugado à peroxidase (Sigma)	cabra	1:600	---

3.6.3 Identificação de células apoptóticas pelo método de TUNEL

Para esta análise utilizou-se os reagentes do kit TdT FragELTM DNA *Fragmentation Detection kit* (Calbiochem), seguindo-se as recomendações do fabricante. Foram realizadas padronizações no protocolo, como segue: os cortes foram submetidos a 3 banhos de água corrente para a remoção do meio de montagem Tissue Tek®. Em seguida, os cortes foram lavados com tampão Tris-salino (TBS, do inglês *Tris buffered saline*) 0,1 M, pH 7,4. Os cortes foram permeabilizados com proteinase K diluída em tampão Tris 10 mM, pH 8,0 (1:500), lavados com TBS 20 mM e em seguida, lavados com metanol : peróxido (9:1) para o bloqueio das peroxidases endógenas. Na sequência destes procedimentos, os cortes foram preparados para a incubação com a enzima de marcação do TUNEL a 37°C, tratados com DAB® (3,3'diaminobenzidina), contracorados com verde de metila, sendo as lâminas montadas com Entelan®. Para os controles negativos foram seguidos os mesmos procedimentos, suprimindo-se a adição da enzima de marcação do TUNEL.

3.7 ANÁLISES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os ovos em E7 foram fixados em solução de paraformaldeído a 1% por 18h a 4°C. Após a fixação, os ovos foram lavados por 3 vezes de 5 minutos em tampão PBS sem adição de cálcio e magnésio (NaCl + KCl + Na₂HPO₄ + KH₂PO₄ + H₂O destilada), 10 mM, pH 7,8. Os ovos foram homogeneizados por trituração com PBS + Tween®-20 e as células dissociadas com tripsina (Quimis) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após, as células foram lavadas com BSA a 10% por 45 minutos para o bloqueio dos sítios inespecíficos e centrifugadas (640 X g) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sedimento e o vitelo foram desprezados, utilizando-se somente a fração intermediária com as células em suspensão. Amostras de células foram separadas em alíquotas de 1 mL contendo aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células. As células foram incubadas com os mesmos anticorpos primários descritos no Quadro 2, durante 60 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos secundários fluorescentes (Quadro 3) por 45 minutos à 4°C protegidas da luz. A análise das marcações celulares foi realizada no citômetro de fluxo (FACSCanto II). Para verificação de dímeros de timina foi adotado o mesmo protocolo, exceto pelo fixador, sendo utilizado metanol PA por 8 minutos ao abrigo de luz. As análises por citometria de fluxo foram realizadas com base em 10.000 eventos celulares.

3.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS RESULTADOS

A quantificação das células marcadas por imuno-histoquímica colorimétrica e submetidas à técnica de TUNEL foi realizada através do método estereológico utilizando-se a graticula de Weibel (FREERE; WEIBEL, 1967). As análises de citometria de fluxo foram feitas pelo programa Flowing Software versão 2.5. Os resultados quantitativos referentes às marcações celulares, bem como das análises por citometria foram avaliados no programa estatístico Statistica® versão 6.0 para Windows. Para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram apresentados em média (\pm erro padrão).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA MORFOLOGIA EXTERNA DOS EMBRIÕES *IN VIVO*

Amostras de ovos das fêmeas dos grupos controle e irradiado foram analisadas ao estereomicroscópio mostrando que após a irradiação com 310 mW/cm^2 , os embriões de *M. olfersi* apresentaram alterações morfológicas, relacionadas principalmente à perda da transparência dos embriões (Figura 9). Este tipo de alteração foi observada em 4,10% dos embriões do grupo irradiado-claro; 13% nos embriões do grupo irradiado e mantido no escuro e em 1,3% e 1% dos embriões dos grupos controle-claro e escuro, respectivamente.

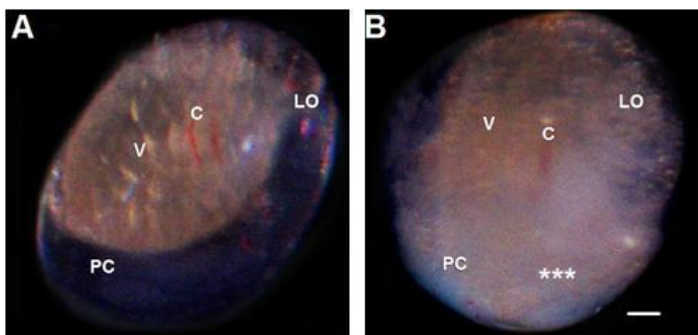


Figura 9. Embriões de *M. olfersi* em E7, destacando alterações na transparência das células embrionárias após a irradiação com UVB. (A) Embrião controle; (B) embrião irradiado. Asteriscos indicam a opacidade das células embrionárias. C, cromatóforos; LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Barra de escala = 100 μm .

A análise dos embriões irradiados, após 2 dias de permanência em condição de luz visível ou escuro, demonstrou que nas condições experimentais adotadas neste trabalho não houve alteração no ritmo de desenvolvimento dos embriões. Ou seja, o estágio do desenvolvimento esperado para o dia da análise correspondia com o estágio efetivamente observado.

4.2 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE DÍMEROS DE PIRIMIDINA

Considerando o efeito da radiação UVB sobre o DNA, procedeu-se a análise da formação dímeros de pirimidina (timina - timina e timina - citosina) pela técnica de citometria de fluxo. A Figura 10 representa o perfil geral da população de células embrionárias consideradas viáveis para as marcações celulares por citometria de fluxo. Para a verificação da integridade celular, as amostras células foram coradas previamente com iodeto de propídeo. A partir de então foi determinada a população alvo (P.a) com base nos parâmetros de tamanho versus complexidade.

O Quadro 4 apresenta os marcadores celulares utilizados, o número de eventos selecionados em cada amostra (10.000 cada repetição), o números de eventos na P.a, bem como o número de células marcadas na P.a.

Quadro 4. Relação de marcadores utilizados na citometria de fluxo e parâmetros utilizados para análise dos dados .

Marcador celular	Grupo	Nº total de eventos utilizados	Nº total de eventos na população alvo (P.a)	Nº de células marcadas na (P.a)
Anti-dímeros de pirimidina	Controle-claro	30.000	3.452	53
	Controle-escuro	30.000	3.299	54
	Irradiado-claro	30.000	3.228	37
	Irradiado-escuro	30.000	3.542	144
	Irradiado- imediato	30.000	7.204	392
Anti-p21	Controle	30.000	25.538	12.939
	Irradiado	30.000	29.715	13.862
Anti-PCNA	Controle	30.000	27.729	141
	Irradiado	30.000	25.500	222
Anti-p53	Controle	30.000	17.974	683
	Irradiado	30.000	19.541	761

Nos embriões irradiados com UVB observou-se a formação de dímeros de pirimidina (Figura 11), demonstrando o efeito direto desta radiação sobre o DNA das células de embriões de *M. olfersi*. Os embriões irradiados e analisados depois de uma hora apresentaram cerca de 4,83% ($\pm 0,27$) de células positivas ao anticorpo anti-dímeros de pirimidina, o que representa diretamente a formação de dímeros no DNA. De forma similar, embriões irradiados e mantidos no escuro apresentaram cerca de 4,09% ($\pm 0,88$) de dímeros. Já os embriões do grupo irradiado-claro apresentaram 1,62% ($\pm 0,41$) de dímeros diferindo significativamente dos dois grupos acima descritos. Os embriões dos grupos controle-claro e controle-escuro apresentaram 1,45% ($\pm 0,33$) e 1,78% ($\pm 0,21$), respectivamente.

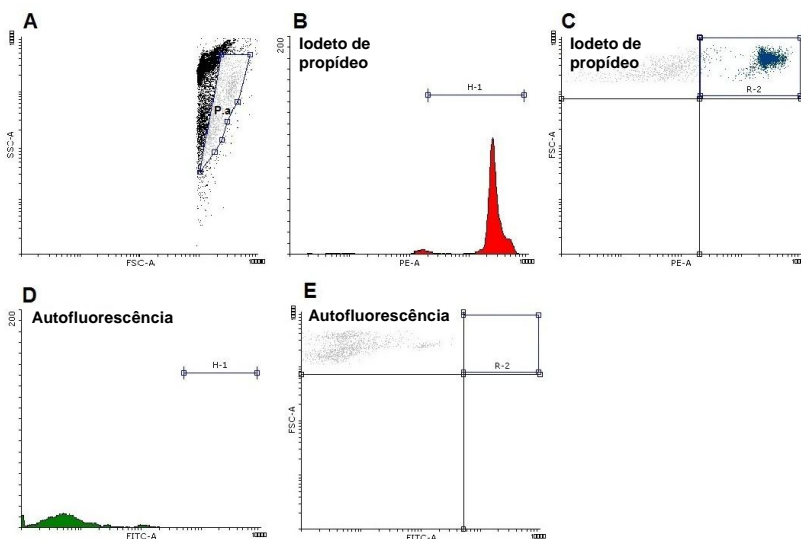


Figura 10. Perfil de distribuição celular nas análises por citometria de fluxo das amostras obtidas de embriões de *M. olfersi* em E7. (A) Representação total das células/fragmentos da amostra obtida por maceração, mostrando a região das células de interesse denominada população alvo (P.a). (B) Histograma da população alvo, baseado no critério de integridade celular utilizando iodeto de propídeo versus tamanho celular (H-1). (C) *Dot plot* demonstrando a autofluorescência e as células marcadas com iodeto de propídeo na região (R-2) da população alvo. (D) Histograma da amostra “branco” para eliminação da autofluorescência celular da região selecionada, baseado no comprimento de onda 488 nm versus tamanho. (E) *Dot plot* demonstrando a autofluorescência das células da população alvo.

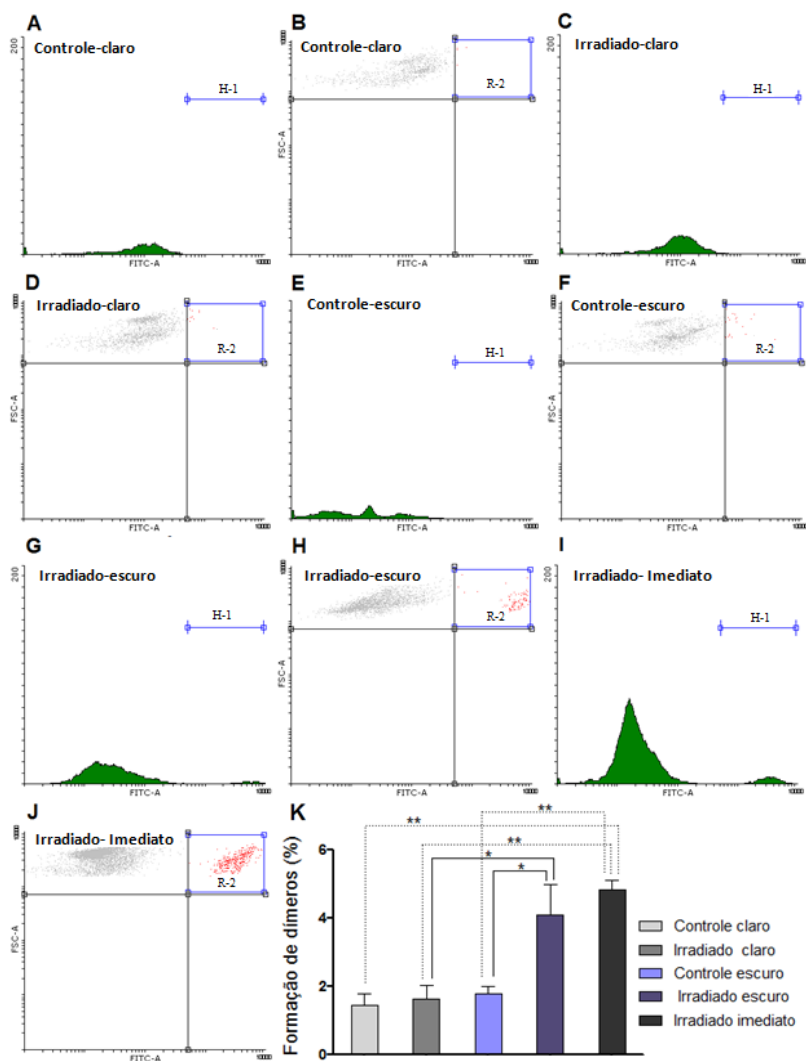


Figura 11. Análise por citometria de fluxo da formação de dímeros de pirimidina em amostras de embriões de *M. oleari* em E7. (A, C, E, G e I) Histogramas representando o número de células positivas para o anticorpo anti-dímeros de pirimidina na região H-1. (B, D, F, H e J) Dot plot para melhor visualização do número de células marcadas na região R-2. (A e B) Controle-claro; (C e D) Irradiado-claro; (E e F) Controle-escuro; (G e H) Irradiado-escuro; (I e J) Irradiado-imediato. (K) Síntese das porcentagens de células marcadas com o anticorpo anti-dímeros de timina nos diferentes grupos

experimentais. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). Asteriscos indicam diferença significativa entre as médias dos grupos (* $P \leq 0,001$) (** $P \leq 0,0001$), analisada através de ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. $n \cong 9.000$ ovos/grupo, em três experimentos independentes.

Considerando que os grupos experimentais apresentados no Quadro 1 foram estabelecidos principalmente para o reconhecimento da ocorrência de danos ao DNA e da possibilidade do seu reparo em condições de claro e escuro, as análises a seguir serão apresentadas agrupando-se os dados dos grupos controle e dos grupos irradiados.

4.3 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para a quantificação do número de células em proliferação nos embriões, realizada a técnica de imuno-histoquímica foi utilizado o anticorpo PHH3. Os embriões do grupo controle apresentaram densidade média de células em proliferação (NA) igual a $40,03 \text{ mm}^2$ ($\pm 2,36$) (Figura 12 A, B e E), a qual diferiu significativamente dos embriões do grupo irradiado, cujo NA foi $32,08 \text{ mm}^2$ ($\pm 1,44$) ($P \leq 0,05$) (Figura 12 C, D e E). É importante salientar que a proliferação celular ocorreu em todas as regiões do embrião, não podendo ser identificados sítios específicos de proliferação. As marcações foram observadas desde a região anterior, lobo óptico (LO), até a região posterior, que corresponde à papila caudal (PC).

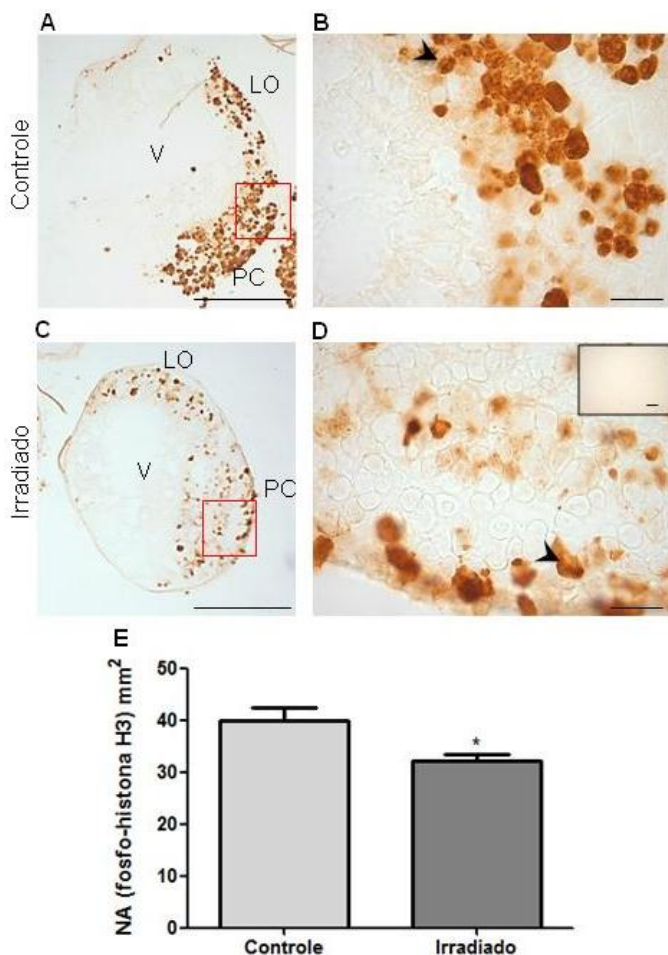


Figura 12. Imunomarcacão para proliferação celular utilizando anticorpo anti-fosfohistona H3 em embriões de *M. oleari* em E7. (A) Vista sagital do embrião do grupo controle e (B) detalhe de A. (C) Vista sagital do embrião do grupo irradiado com UVB e (D) detalhe de C. Inseto em D corresponde ao controle negativo da reação por imuno-histoquímica. (E) Gráfico demonstra a densidade (NA) de células positivas para fosfohistona H3. Cabeça de seta indica célula imunorreativa. LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). Asterisco indica diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$), analisada através de ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. $n \cong 90$ embriões por grupo. Barras de escala: (A e C) = 200 μ m; (B e D) = 20 μ m.

4.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Os embriões do grupo controle apresentaram maior expressão da proteína p21, sendo o NA para as células marcadas por imunohistoquímica igual a $118,41 \text{ mm}^2 (\pm 4,74)$ (Figura 13 A, B e E), o qual não diferiu estatisticamente dos embriões irradiados com UVB, cujo NA foi de $105,42 \text{ mm}^2 (\pm 4,63)$ (Figura 13 C, D e E). Contudo, quando a expressão de p21 foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo, não foram observadas diferenças significativas para as médias de células positivas para o anticorpo anti-p21, entre os grupos controle ($43,37\% \pm 4,67$) e irradiado com UVB ($50,96\% \pm 3,00$) (Figura 14).

Nos embriões do grupo controle, a expressão de PCNA foi quantificada pela densidade de células positivas (NA) que foi igual a $93,20 \text{ mm}^2 (\pm 3,81)$, valor muito semelhante ao encontrado nos embriões irradiados com UVB, cujo NA foi de $93,20 \text{ mm}^2 (\pm 3,65)$ (Figura 15). É importante observar que a expressão desta proteína ocorreu em todas as regiões do embrião, não sendo reconhecidas regiões específicas de marcação. Contudo, quando a expressão de PCNA foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo, observou-se no grupo controle uma expressão significativamente menor desta proteína ($0,24\% \pm 0,03$), quando comparado com o grupo irradiado ($0,43\% \pm 0,04$) ($P \leq 0,001$) (Figura 16).

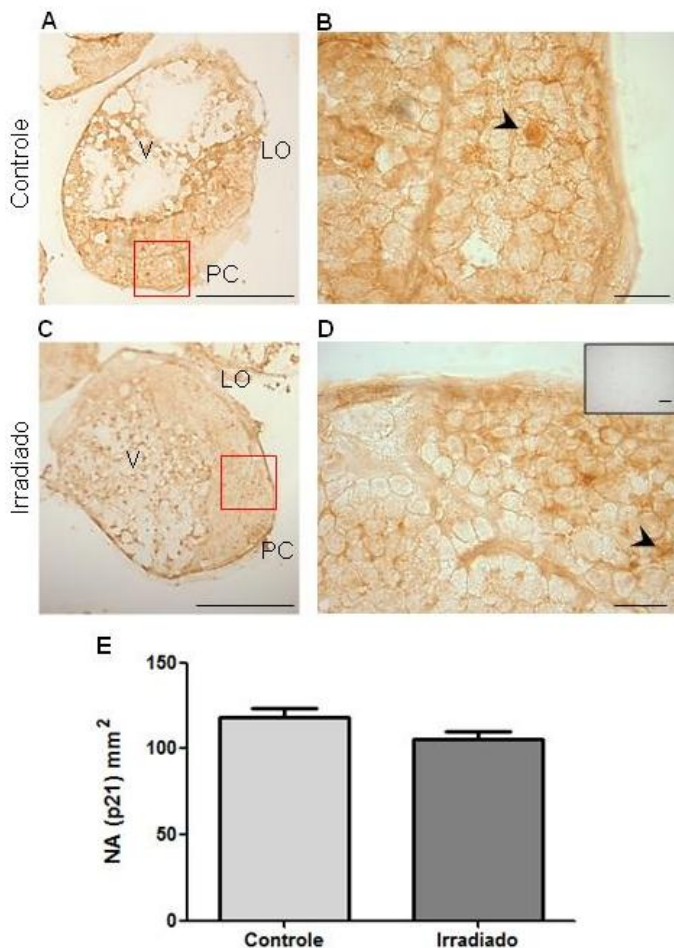


Figura 13. Imunomarcacão para identificao da expressão da proteína p21 em embriões de *M. olfersi* em E7. (A) Vista sagital do embrião do grupo controle e (B) detalhe de A. (C) Vista sagital do embrião do grupo irradiado com UVB e (D) detalhe de C. Inserto em D corresponde ao controle negativo da reao por imuno-histoquímica. (E) Gráfico demonstra a densidade (NA) de células positivas para o anticorpo anti-p21. Cabeça de seta indica célula imunorreativa. LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). Analisada através de ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. $n \cong 90$ embriões por grupo. Barras de escala: (A e C) = 200 μm ; (B e D) = 20 μm .

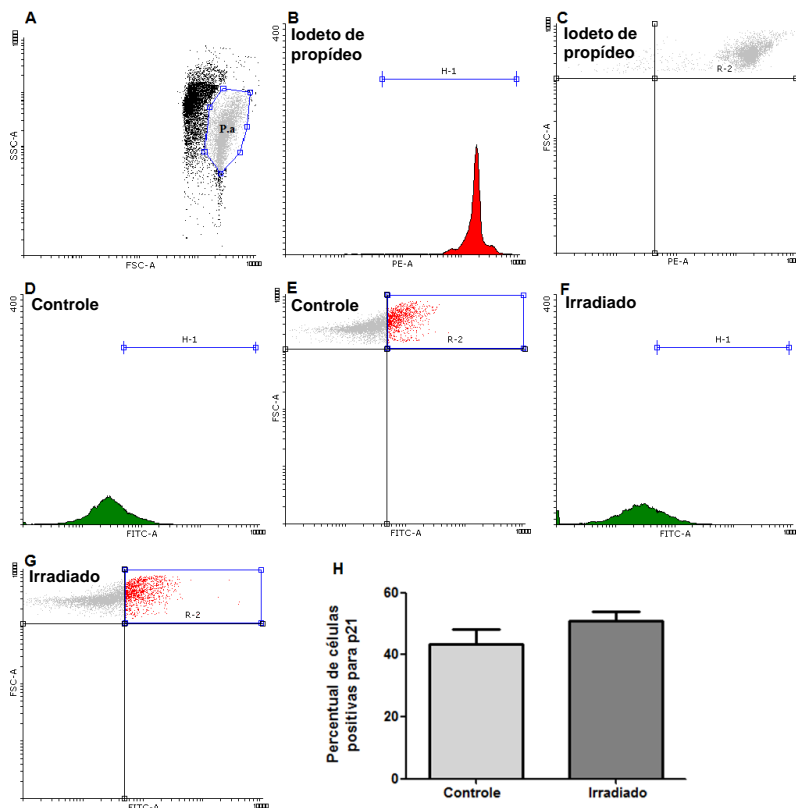


Figura 14. Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína p21 em amostras de embriões de *M. oleari* em E7. (A) Representação total das células/fragmentos da amostra obtida por maceração, mostrando a região das células de interesse denominada população alvo (P.a). (B) Histograma da população alvo, baseado no critério de integridade celular utilizando iodeto de propídeo versus tamanho celular mostrando a integridade celular (H-1). (C) *Dot plot* demonstrando a autofluorescência e a células marcadas com iodeto de propídeo na região (R-2) da população alvo. (D e F) Histogramas representando o número de células positivas para o anticorpo anti-p21 na região denominada H-1. (E e G) *Dot plot* para melhor visualização do número de células marcadas na região denominada R-2. (D e E) Controle; (F e G) Irradiado. (H) Síntese das porcentagens de células marcadas com o anticorpo anti-p21. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n \cong 9.000$ ovos/grupo, em três experimentos independentes.

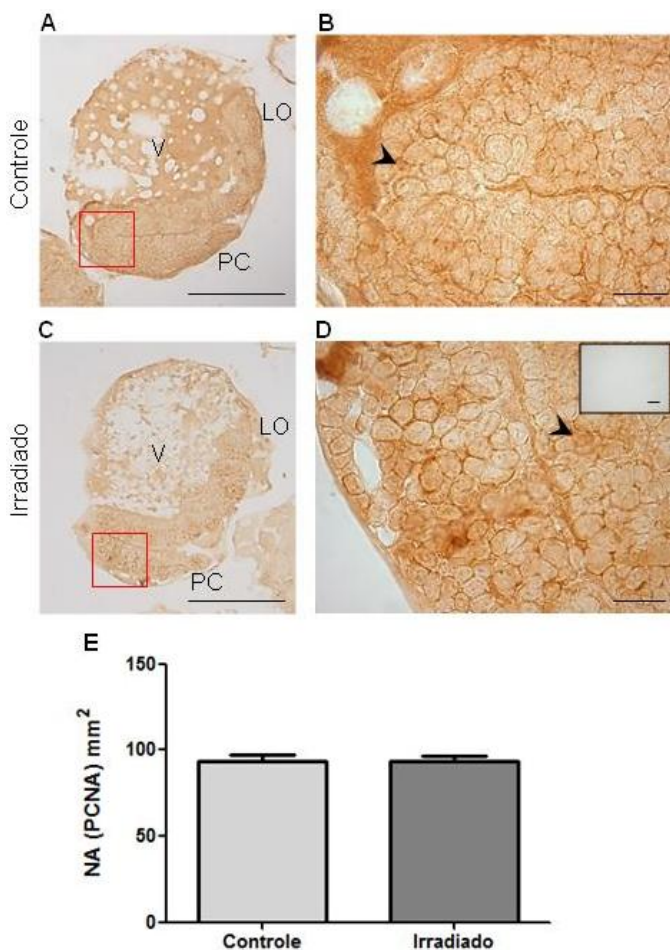


Figura 15. Imunomarcacão para identificao da expressão da proteína PCNA em embriões de *M. olfersi* em E7. (A) Vista sagital do embrião do grupo controle e (B) detalhe de A. (C) Vista sagital do embrião do grupo irradiado com UVB e (D) detalhe de C. Inseto em D corresponde ao controle negativo da reao por imuno-histoquímica. (E) Gráfico demonstra a densidade (NA) de células positivas para o anticorpo anti-PCNA. Cabeça de seta indica célula imunorreativa. LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n \cong 90$ embriões por grupo. Barras de escala: (A e C) = 200 μ m; (B e D) = 20 μ m.

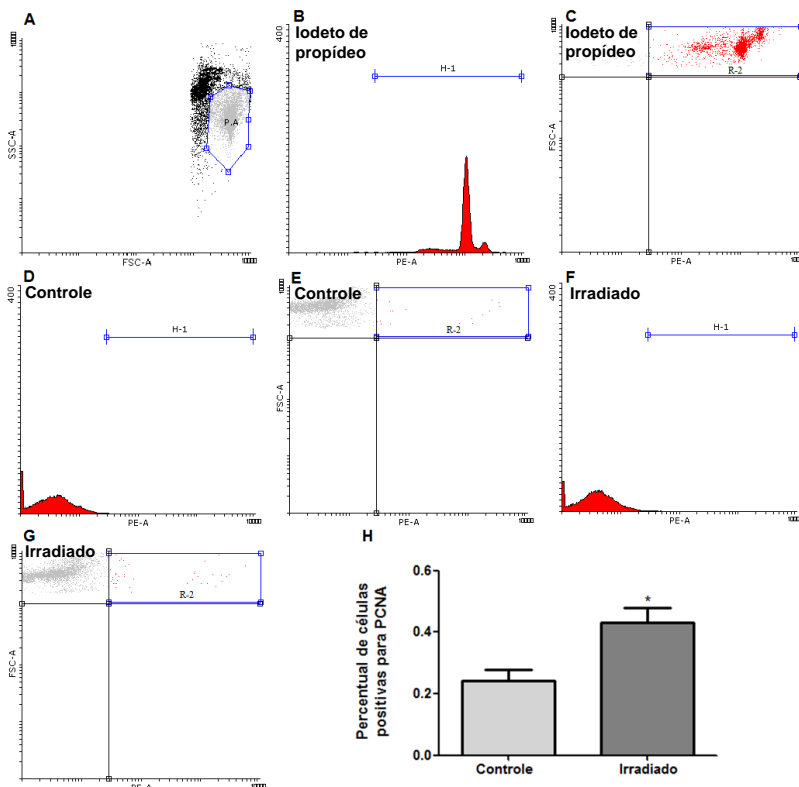


Figura 16. Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína PCNA em amostras de embriões de *M. olearii* em E7. (A) Representação total das células/fragmentos da amostra obtida por maceração, mostrando a região das células de interesse denominada população alvo (P.a). (B) Histograma da população alvo, baseado no critério de integridade celular utilizando iodeto de propídeo versus tamanho celular mostrando a integridade celular (H-1). (C) Dot plot demonstrando a autofluorescência e a células marcadas com iodeto de propídeo na região (R-2) da população alvo. (D e F) Histogramas representando o número de células positivas para o anticorpo anti-PCNA na região denominada H-1. (E e G) Dot plot para melhor visualização do número de células marcadas na região denominada R-2. (D e E) Controle; (F e G) Irradiado. (H) Síntese das porcentagens de células marcadas com o anticorpo anti-PCNA. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). Asterisco indica a diferença significativa entre as médias dos grupos ($P \leq 0,001$), analisada através de ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. $n \cong 9.000$ ovos/grupo, em três experimentos independentes.

Os embriões do grupo controle apresentaram menor expressão da proteína p53, sendo o NA para as células marcadas por imunohistoquímica igual a $92,43 \text{ mm}^2 (\pm 3,7)$ (Figura 17 A, B e E), o qual diferiu significativamente dos embriões irradiados com UVB, cujo NA foi de $122,23 \text{ mm}^2 (\pm 4,58)$ ($P \leq 0,05$) (Figura 17 C, D e E). É importante salientar que a expressão de p53 foi identificada em todas as regiões do embrião, não podendo ser reconhecidos sítios específicos de proliferação. Contudo, quando a expressão de p53 foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo, não foram observadas diferenças significativas para as médias de células positivas para o anticorpo anti-p53, entre os grupos controle, 3,64% ($\pm 0,42$) e irradiado com UVB, 3,61% ($\pm 0,63$) (Figura 18).

4.5 ANÁLISE DA MORTE CELULAR

Pelo método de TUNEL foram observados núcleos marcados nos embriões irradiados comprovando a fragmentação do DNA associada ao processo apoptótico. No grupo controle o NA de células marcadas foi de $11,45 \text{ mm}^2 (\pm 4,76)$ (Figura 19 A, B e E), já no grupo irradiado o NA observado foi significativamente maior $48,12 \text{ mm}^2 (\pm 7,49)$ (Figura 19 C, D e E) ($P \leq 0,0001$). As marcações foram observadas em todas as regiões dos embriões.

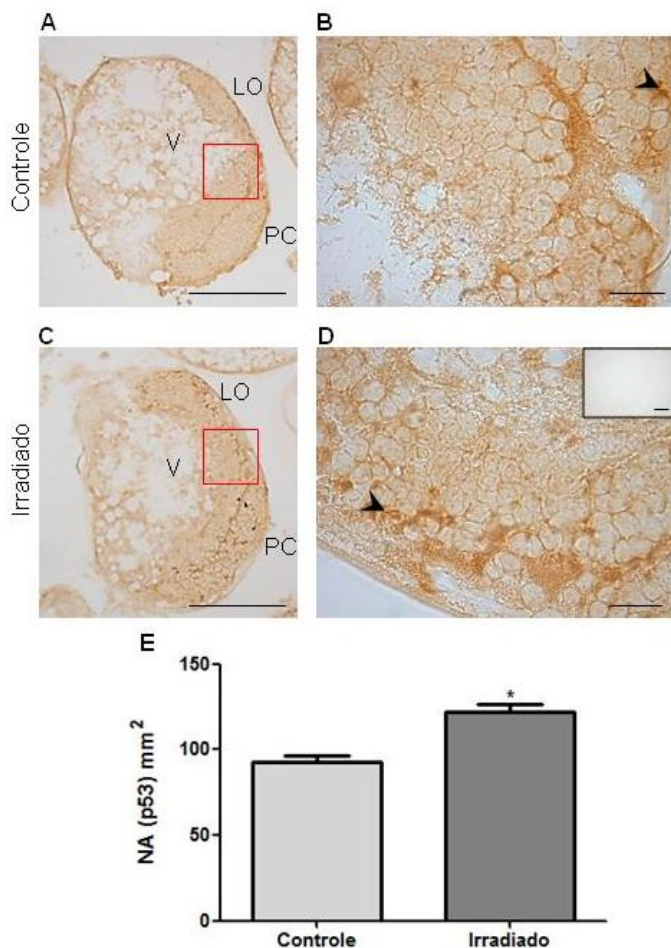


Figura 17. Imunomarcção para identificação da expressão da proteína p53 em embriões de *M. oleari* em E7. (A) Vista sagital do embrião do grupo controle e (B) detalhe de A. (C) Vista sagital do embrião do grupo irradiado com UVB e (D) detalhe de C. Inseto em D corresponde ao controle negativo da reação por imuno-histoquímica. (E) Gráfico demonstra a densidade (NA) de células positivas para o anticorpo anti-p53. Cabeça de seta indica célula imunorreativa. LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). Asterisco indica diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$), analisada através de ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. $n \cong 90$ embriões por grupo. Barras de escala: (A e C) = 200 µm; (B e D) = 20 µm.

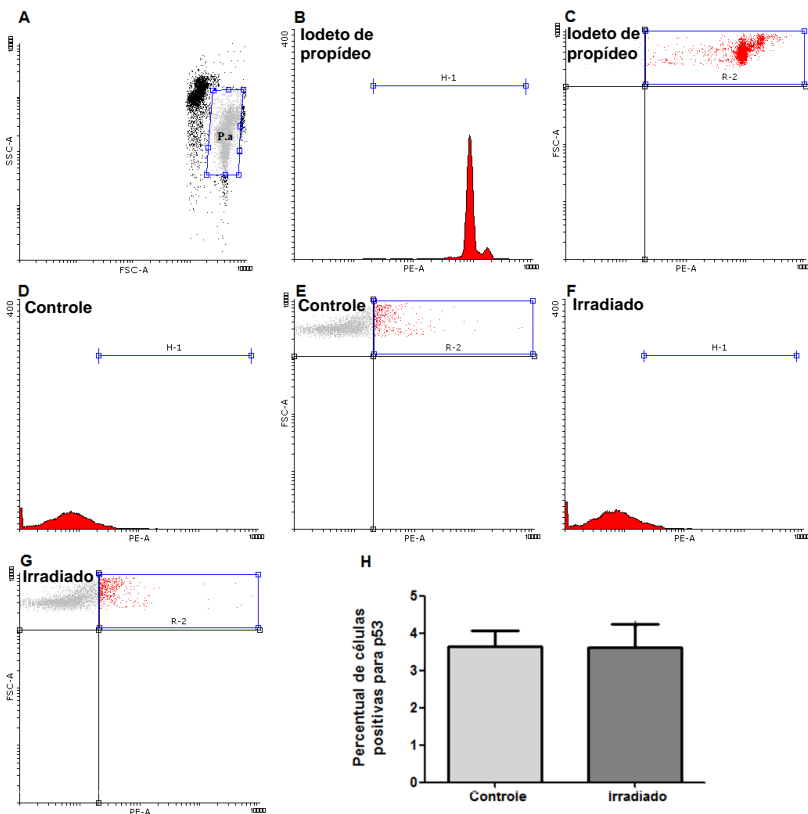


Figura 18. Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína p53 em amostras de embriões de *M. oleari* em E7. (A) Representação total das células/fragmentos da amostra obtida por maceração, mostrando a região das células de interesse denominada população alvo (P.a). (B) Histograma da população alvo, baseado no critério de integridade celular utilizando iodeto de propídeo versus tamanho celular mostrando a integridade celular (H-1). (C) *Dot plot* demonstrando a autofluorescência e a células marcadas com iodeto de propídeo na região (R-2) da população alvo. (D e F) Histogramas representando o número de células positivas para o anticorpo anti-p53 na região denominada H-1. (E e G) *Dot plot* para melhor visualização do número de células marcadas na região denominada R-2. (D e E) Controle; (F e G) Irradiado. (H) Síntese das porcentagens de células marcadas com o anticorpo anti-p53. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n \cong 9.000$ ovos/grupo, em três experimentos independentes.

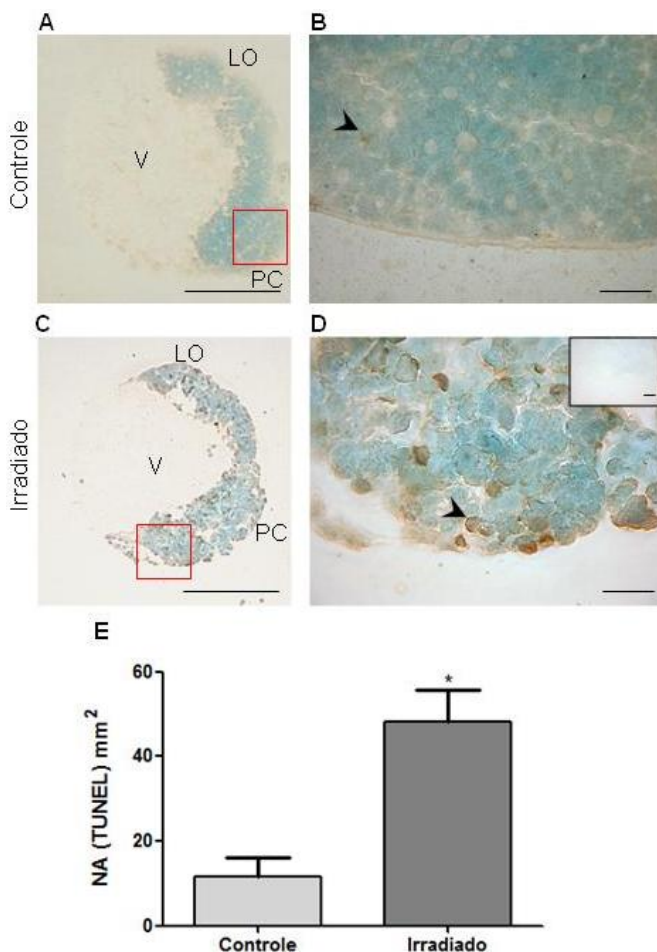


Figura 19. Análise da ocorrência em embriões de *M. olfersi* em E7 de células apoptóticas marcadas pelo método de TUNEL. (A) Vista sagital do embrião do grupo controle e (B) detalhe de A. (C) Vista sagital do embrião do grupo irradiado com UVB e (D) detalhe de C. Inseto em D corresponde ao controle negativo da reação por imuno-histoquímica. (E) Gráfico demonstra a densidade (NA) de células marcadas. Cabeça de seta indica célula em apoptose. LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). Asterisco indica diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,0001$), analisada através de ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. $n \cong 90$ embriões por grupo. Barras de escala: (A e C) = 200 μ m; (B e D) = 20 μ m.

O Quadro 5 demonstra uma síntese das intensidades das marcações celulares realizadas no presente estudo e a Figura 20 representa os diversos efeitos celulares decorrentes da exposição de embriões de *M. olfersi* à radiação UVB.

Quadro 5. Relação de marcadores utilizados e quantificação dos dados obtidos.

Grupo	Marcações celulares					
	Dímeros de pirimidina	PCNA	p21	p53	PHH3	TUNEL
Irradiado-imediato	+++	*	*			*
Irradiado-claro	+	++	+	+	--	+++
Irradiado-escuro	+++					
Controle-claro	+	+	+	+	+++	+
Controle-escuro	+					

Símbolos indicam intensidade das marcações: reduzida (--), fraca (+), moderada (++) e intensa (+++).

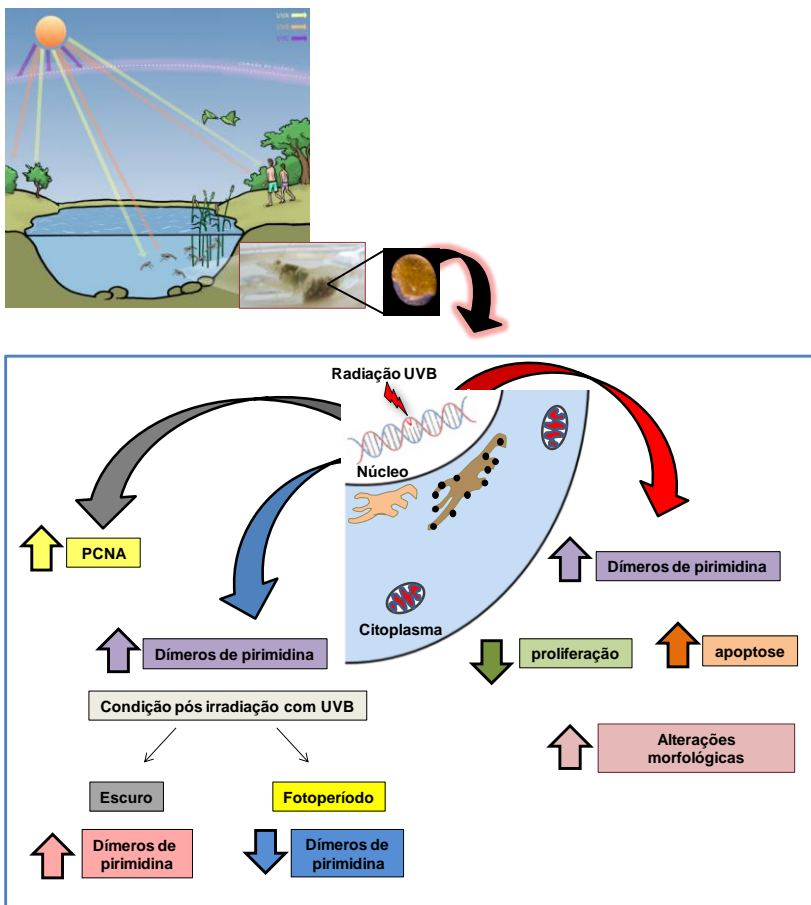


Figura 20. Síntese dos efeitos da radiação UVB em embriões de *M. olfersi*.

A radiação UVB atinge diretamente o DNA das células embrionárias, induzindo a formação de dímeros de pirimidina e o aumento na expressão da proteína PCNA. A presença de dímeros pode interferir no ciclo celular, reduzindo a proliferação e aumentando a apoptose, o que pode resultar em alterações morfológicas. Em condição de escuro, os embriões de *M. olfersi* apresentaram quantidade de dímeros similar a quantidade observada logo após o insulto da radiação. Quando os embriões irradiados permaneciam em condição de fotoperíodo natural, foi observado diminuição no número de dímeros.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram investigados os efeitos da radiação UVB sobre os embriões *M. olfersi* em E7. A principal meta foi reconhecer se os embriões de camarão de água doce, os quais estão expostos na natureza a intensidades elevadas de radiação UV, apresentam alterações induzidas pela radiação UVB e ainda, se um sistema de reparo aos danos no DNA é ativado pela luz visível.

A liberação de compostos CFCs e BFCs na atmosfera, resultante da atividade humana, promove a rarefação do ozônio estratosférico, pois compromete a formação do gás ozônio. Uma vez rarefeita, a camada de ozônio deixa de atuar no controle da incidência da radiação, facilitando a passagem da radiação UVB para a superfície terrestre. Essa maior intensidade de energia da radiação UV que atinge a superfície penetra nos ambientes aquáticos e provoca efeitos nocivos nos organismos expostos (CRUTZEN, 1974; DIFFEY, 1991; KIRCHHOFF et al., 1996; KARENTZ, 2008; SHANKLIN, 2010).

Desde a década de 1970, com a publicação dos trabalhos de Molina e Rowland (1974) e Crutzen (1974), muitos estudos têm sido realizados, principalmente com tecidos humanos (CADET et al., 2005; GALLAGHER; LEE, 2006; BERTAGNOLLI et al., 2007; MAHMOUD et al. 2008; MONTAGNER; COSTA, 2009; BEHRENDT et al., 2010; NASSER, 2010; DUPONT et al., 2013). Mais recentemente, no final da década de 1990, os estudos foram ampliados para outros grupos animais, dentre os quais destacamos os organismos aquáticos, como ouriço do mar (LESSER et al., 2003; NAHON et al., 2009; CAMPANALE et al., 2011), gastrópodes (PRZESLAWSKI et al., 2005), crustáceos (CYWINSKA et al., 2000; VARGAS et al., 2010; MORESINO et al., 2011), peixes (CHARRON et al., 2000; LESSER et al., 2001; DONG et al., 2007; JOKINEN et al., 2011) e anfíbios (BLAUSTEIN et al., 1997; BELDEN et al., 2000; HAKKINEN et al., 2001; ANKLEY et al., 2002; BLAUSTEIN; BELDEN, 2003).

Na Ilha de Santa Catarina, as fêmeas ovígeras de *M. olfersi* habitam ambientes de águas claras e de pouca profundidade, onde a radiação UVB penetra com facilidade e, por consequência, seus embriões também estão expostos a esta radiação. Considerando a hipótese de que embriões são mais sensíveis do que as larvas e adultos (EPEL et al., 1999; BANCROFT et al., 2007), faz-se necessário ampliar os trabalhos que abordam os efeitos dessa radiação, pois a maioria dos trabalhos em crustáceos enfoca os efeitos da radiação UVB diretamente

sobre os adultos (MIGUEL et al., 2002, 2007; GOUVEIA et al., 2005; YU et al., 2009; VARGAS et al., 2010). Sendo assim, simulamos em laboratório, a irradiância de radiação UVB que os camarões de *M. olfersi* recebem normalmente na natureza durante a estação reprodutiva (NAZARI et al., 2010; 2013).

A análise da morfologia externa dos embriões demonstrou que a radiação UVB, na incidência de 310 mW/cm^2 , alterou principalmente a transparência das células embrionárias, tornando-as opacas. É importante salientar que os embriões irradiados que permaneceram em condições de escuro apresentaram maior opacidade celular do que os embriões que foram mantidos em condição de luz visível. Esta foi a primeira evidência em nosso trabalho, da existência de um mecanismo de reparo mediado por luz, pois os embriões mantidos em fotoperíodo natural apresentaram uma menor opacidade celular.

A ocorrência de fotoreparo aos danos causados pela radiação UVB tem sido investigada em embriões e larvas de anfíbios, peixes e crustáceos. Smith et al. (2002) investigaram a existência da enzima fotoliase em embriões de diversas espécies de anfíbios (*Rana sylvatica*, *Rana pipiens*, *Rana clamitans*, *Ambystoma laterale*, *Ambystoma maculatum*) constatando a ocorrência de fotoreparo aos danos induzidos pela radiação UVB. Dong et al. (2007) relataram em seu trabalho que embriões de peixe da espécie *Danio rerio* irradiados com UVB apresentavam alterações morfológicas e que, após a exposição à radiação UVA, recuperavam a morfologia normal. Em larvas de copépodes, *Calanus sinicus* a radiação UVB provocou alterações morfológicas e diminuição nas taxas de eclosão e quando expostos à radiação UVA e luz visível esses danos foram minimizados (NAGANUMA et al., 1997). Estudos com o microcrustáceo *Daphnia pulicaria* demonstraram que quando expostos à radiação UVB diminuía a taxa de sobrevivência destes invertebrados. Após a exposição à radiação UVA e luz visível, as taxas de sobrevivência destes indivíduos aumentaram (WILLIAMSON et al., 2002; MACFADYEN et al., 2004; CONNELLY et al., 2009).

De um modo geral, os estudos relatam a ocorrência de múltiplas alterações morfológicas decorrentes da exposição à radiação UVB. Contudo, verificou-se principalmente a opacidade das células, sem reconhecer alterações estruturais mais severas. Nazari et al. (2010) relatam que embriões de *M. olfersi* irradiados com UVB apresentaram, além de opacidade celular, outras alterações relacionadas ao formato do olho e dos apêndices corporais. Certamente essas alterações só puderam ser reconhecidas em embriões nos estágios mais adiantados do

desenvolvimento. Como no presente trabalho estudamos embriões em E7, cujas estruturas embrionárias encontram-se ainda em formação e não estão totalmente estruturadas, torna-se difícil reconhecer alterações estruturais específicas. Por outro lado, esta idade embrionária foi escolhida justamente porque os embriões encontram-se em processo de morfogênese e organogênese ainda iniciais, sendo formados por poucas camadas de células, o que contribui para a realização das análises micromorfológicas propostas.

As alterações morfológicas observadas no presente trabalho indicam que a irradiância de UVB utilizada também interfere de algum modo nos mecanismos celulares dos embriões de *M. olfersi*. Assim, investigamos a formação de dímeros de pirimidina e constatamos o efeito direto da radiação UVB sobre o DNA das células embrionárias. Verificamos, ainda, que a formação de dímeros no DNA de *M. olfersi* foi identificada imediatamente após a irradiação com UVB, indicando tanto a gravidade do insulto, como a vulnerabilidade das células embrionárias. Considerando que o fotorreparo é um mecanismo comum a muitos invertebrados, nossa expectativa era de que este mecanismo também fosse ativado nos embriões de *M. olfersi*. Contudo, a literatura é muito escassa no que diz respeito a registros de fotorreparo em crustáceos (NAGANUMA et al., 1997; MACFADYEN et al., 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os embriões do grupo irradiado-escuro mantiveram grande quantidade de dímeros em relação aos outros grupos, sendo a porcentagem semelhante ao grupo irradiado-imediato. Isso revela que os embriões que ficaram em condições de fotoperíodo natural tiveram uma redução considerável no volume de dímeros, aproximando-se ao encontrado no grupo controle-claro. Esses dados comprovam a hipótese de que os embriões de *M. olfersi* possuem capacidade de reparo celular, quando expostos à condições de luz visível.

A formação de dímeros de pirimidina, que é classicamente referida como dano específico da radiação UVB (GOODSELL, 2001), também foi reconhecida em outros grupos animais. Elevada taxa de formação de dímeros de pirimidina, após a exposição à radiação UVB, foi verificada em embriões de ouriço do mar (LESSER et al., 2003; LESSER; BARRY, 2003), em crustáceos (MACFADYEN et al., 2004; CONNELLY et al., 2009), em embriões de peixe (ZENG et al., 2009; VEHNÄINEN et al., 2012) e em larvas de anfíbios (PANDELOVA et al., 2006).

Em resposta à formação de dímeros de pirimidina, mecanismos celulares fundamentais, como a transcrição e replicação, podem estar

atrasados ou até mesmo interrompidos, conforme a extensão do dano. Uma maquinaria celular é ativada, primeiramente para o reconhecimento do dano e posteriormente para o seu reparo (RIVA et al., 2001; PIETENPOL; STEWART, 2002; ESSERS et al., 2005). Sendo assim, é esperada uma parada no ciclo celular até que as divisões possam prosseguir, uma vez que tenha ocorrido o reparo. Assim, proteínas envolvidas na checagem do ciclo celular são recrutadas e têm sua expressão aumentada (KAUFMANN, 1996; LESSER et al., 2001; 2003; ADAMS et al., 2012). Neste estudo investigamos os efeitos da radiação UVB sobre a proliferação celular e ainda, a expressão de três proteínas de checagem do ciclo celular.

Quando verificada a taxa de proliferação destas células embrionárias, constatou-se uma redução significativa do número de células em proliferação, o que está de acordo com o esperado. Os resultados para proliferação celular foram obtidos a partir das combinações dos embriões dos grupos controle-claro e controle-escuro, que passaram a constituir um único grupo controle e também dos embriões dos grupos irradiado-claro e irradiado-escuro, que passaram a constituir um único grupo, denominado grupo irradiado. Tal procedimento foi adotado, pois a separação de claro e escuro foi utilizada somente para o reconhecimento de reparo dos dímeros de pirimidina mediado por luz. Poucos são os trabalhos que abordam o efeito da radiação UVB na proliferação celular em organismos aquáticos, o que dificulta a comparação dos nossos dados com a literatura. Contudo, consideramos relevante estudar esse mecanismo celular, que é crucial para o desenvolvimento durante os processos de morfogênese e organogênese.

É importante ressaltar que no desenvolvimento, as divisões celulares são muito rápidas (NINOV et al., 2009), o que pode comprometer o reconhecimento de eventuais danos e promover a perpetuação dos mesmos nas células filhas. Sendo assim, interferências na proliferação celular pode ser prejudicial tanto morfológicamente, quanto fisiologicamente podendo inclusive comprometer a sobrevivência dos organismos afetados.

Em resposta à radiação UV, é esperado que as células superexpressem proteínas envolvidas no mecanismo de checagem do ciclo celular (KAUFMANN, 1996; ADAMS et al., 2012). Assim, no presente trabalho investigamos a expressão das proteínas p21, p53 e PCNA. Interessantemente, nossos resultados mostram que a expressão de p21 não demonstrou diferenças significativas entre os grupos controle e irradiado. Isso nos sugere que p21 pode ter sido recrutada

para o reparo celular anteriormente, ao tempo de análise de 2 dias. Possivelmente se tivéssemos diminuído o tempo pós-irradiação para as análises, poderíamos encontrar uma maior expressão da proteína p21, como observado em células humanas por Mirzayans et al. (2012) nas quais os picos de expressão de p21 foram em 6 horas após a irradiação.

Em continuidade ao estudo da expressão das proteínas, investigamos a p53, a qual esta envolvida tanto em mecanismos de checagem de ciclo, quanto em eventos de diferenciação celular e apoptose (PIETENPOL; STEWART, 2002; BELYI et al., 2010). Neste trabalho os resultados obtidos nas análises de citometria, bem como os da imuno-histoquímica não foram os mesmos, já que a para as análises de imuno-histoquímica foi observada maior expressão de p53 nos embriões. Quando realizada a citometria de fluxo não foi observada diferença na quantidade de células expressando esta proteína. Isso porque, quando realizamos imuno-histoquímica obtemos uma resposta a partir da análise de uma determinada região dos embriões. Já na técnica de citometria de fluxo, a expressão é verificada com todas as células dos embriões, e não somente a visualização de uma fração do corpo. As duas técnicas são válidas, porém cada uma reflete um padrão de análise, um regional como no caso da imuno-histoquímica e outro um panorama geral de todas as células dos embriões. Levando em consideração o padrão total de expressão de p53 nas células embrionárias, podemos sugerir que não ocorreu uma superexpressão de p53 em E7, dois dias depois da irradiação. Segundo Choi e Donehower (1999), a superexpressão de p53 durante o desenvolvimento embrionário não é benéfica, pois pode levar ao aumento de malformações e letalidade embrionária, embora o observado em outros trabalhos tenha sido a superexpressão da proteína p53, após o insulto com UVB (RENZING et al., 1996; CHOI; DONEHOWER, 1999; LESSER et al., 2001, 2003).

A proteína PCNA é considerada fundamental para a replicação e reparo do DNA (CELIS; MADSEN, 1986; ESSERS et al., 2005). Neste sentido, buscamos investigar a expressão desta proteína relacionada ao reparo celular após a irradiação com UVB. Quando observada a expressão da proteína PCNA nos embriões E7 pela técnica de imuno-histoquímica, não foi observada a diferença na expressão de PCNA entre os grupos controle e irradiado. Curiosamente, através da técnica de citometria de fluxo, e obtendo um panorama total das células embrionárias, observamos um significativo aumento da expressão de PCNA nos embriões do grupo irradiado, o que sugere que após a irradiação com UVB essa proteína é aumentada na tentativa de reparo celular. Essers et al. (2005) observaram que o acúmulo de PCNA

ocorreu em locais que apresentam danos no DNA. Por essa razão PCNA vem a servir como indicativo de dano ao DNA.

Na tentativa de reduzir o número de células alteradas pela radiação UVB que não tiveram reparo eficiente, as células podem desencadear o processo de apoptose (EPEL, 2003; DAHMS; LEE, 2010). A apoptose neste caso é ativada para evitar que os danos provocados na célula não sejam passados adiante. Em nosso estudo foi possível observar o aumento de células em apoptose no grupo irradiado com UVB.

Tendo em vista o panorama acima descrito, pode-se constatar que a exposição aos comprimentos de onda mais curtos da radiação UVB, resultam em danos principalmente ao DNA, bem como alterações nas taxas de proliferação e expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular, que podem vir a desencadear o processo de apoptose nas células de embriões de *M. olfersi*. Por consequência, esses comprometimentos causados pela radiação UVB podem comprometer a viabilidade e sobrevivência embrionárias. Extrapolando-se para o que ocorre na natureza, pode-se sugerir que elevados índices de radiação UVB, aos quais os animais estão expostos durante a estação reprodutiva, podem comprometer não somente os embriões, mas também as populações de *M. olfersi*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embriões de *M. olfersi* mostraram-se adequados para os estudos sobre os efeitos da radiação UVB em ambientes artificiais;

A radiação UVB induz alterações morfológicas nos embriões de *M. olfersi*, provocando principalmente opacidade das células embrionárias;

A radiação UVB atinge diretamente o DNA das células de embriões de *M. olfersi*, provocando a formação de dímeros de pirimidina;

Os embriões de *M. olfersi* quando expostos à luz visível apresentam diminuição na quantidade de dímeros de pirimidina formados pela ação da radiação UVB;

A radiação UVB, interfere na proliferação celular de embriões durante a morfogênese e organogênese iniciais;

A expressão da proteína PCNA foi aumentada nos embriões do grupo irradiado;

A superexpressão das proteínas p21 e p53 não foi observada nos embriões E7 dois dias após a irradiação com UVB analisadas por citometria de fluxo;

Os embriões irradiados com UVB tiveram aumento no número de células em apoptose.

Perspectivas

Ampliar a investigação acerca dos danos celulares induzidos pela radiação em embriões de *M. olfersi* como por exemplo a formação de espécies reativas de oxigênio;

Ampliar a investigação dos mecanismos de defesas celulares de embriões através da expressão de Hsp70 e de moléculas do sistema antioxidante;

Levar em consideração a janela de expressão das proteínas investigadas bem como o tempo pós-irradiação e idades embrionárias;

Realizar ensaios para a clonagem do gene da fotoliase, a partir de sequências homólogas de outros animais já descritos no GenBank;

Diversificar o uso de metodologias como por exemplo: ensaios cometas, hibridização *in situ*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, N. L.; CAMPANALE, J. P.; FOLTZ, K. R. Proteomic responses of sea urchin embryos to stressful ultraviolet radiation. **Integrative and Comparative Biology**, v. 52, n. 5, p. 665-680, 2012.
- ALTSHULER, I. et al. An integrated multi-disciplinary approach for studying multiple stressors in freshwater ecosystems: *Daphnia* as a model organism. **Integrative and Comparative Biology**, v. 51, n. 4, p. 623-633, 2011.
- AMMAR, D.; MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman)(Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 2, p. 529-537, 2001.
- ANKLEY, G. T. et al. Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, n. 1, p. 7-16, 2004.
- BANASZAK, A. T. Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. **UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems**, v. 1, p. 329-356, 2003.
- BANCROFT, B. A.; BAKER, N. J.; BLAUSTEIN, A. R. Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis. **Ecology Letters**, v. 10, n. 4, p. 332-345, 2007.
- BANDEIRA, F. et al. Vitamin D deficiency: a global perspective. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 4, p. 640-646, 2006.
- BEHRENDT, L. et al. Induction of cytochrome P450 1 genes and stress response genes in developing zebrafish exposed to ultraviolet radiation. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 1, p. 74-82, 2010.
- BELDEN, L. K.; WILDY, E. L.; BLAUSTEIN, A. R. Growth, survival and behaviour of larval long-toed salamanders (*Ambystoma macrodactylum*) exposed to ambient levels of UV-B radiation. **Journal of Zoology**, v. 251, n. 4, p. 473-479, 2000.

BELYS, V. A. et al. The origins and evolution of the p53 family of genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 6, p. 1-17, 2010.

BERTAGNOLLI, C. et al. Estimativa para cálculo de ozônio total usando dados de UVB E UVA do observatório espacial do sul, Brasil. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 25, p. 9-15, 2007.

BLAUSTEIN, A. R.; BELDEN, L. K. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. **Evolution & Development**, v. 5, n. 1, p. 89-97, 2003.

BLAUSTEIN, A. R. et al. Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 13735-13737, 1997.

BOER, J.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 453-460, 2000.

BRASSEUR, G.; RUDDER, A.; TRICOT, C. Stratospheric response to chemical perturbations. **Journal of Atmospheric Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 261-288, 1985.

BROZYNA, A. et al. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. **Expert Review of Dermatology**, v. 2, n. 4, p. 451-469, 2007.

BUCKUP, L.; BOND-BUCKUP, G. **Os crustáceos do Rio Grande do Sul**. Editora da UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1, p. 3-17, 2005.

CAMPANALE, J. P.; TOMANEK, L.; ADAMS, N. L. Exposure to ultraviolet radiation causes proteomic changes in embryos of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 397, n. 2, p. 106-120, 2011.

CELIS, J. E.; MADSEN, P. Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in

nucleotide excision DNA repair. **FEBS Letters**, v. 209, n. 2, p. 277-283, 1986.

CHARRON, R. A. et al. Ultraviolet-B radiation effects on antioxidant status and survival in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n. 3, p. 327-333, 2000.

CHOI, J.; DONEHOWER, L. A. p53 in embryonic development: maintaining a fine balance. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 55, n. 1, p. 38-47, 1999.

CICERONE, R. J. Changes in stratospheric ozone. **Science**, v. 237, n. 4810, p. 35-42, 1987.

CONNELLY, S. J. et al. Temperature effects on survival and DNA repair in four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 144-152, 2009.

CRUTZEN, P. J. Estimates of possible variations in total ozone due to natural causes and human activities. **Ambio**, p. 201-210, 1974.

CYWINSKA, A.; CRUMP, D.; LEAN, D. Influence of UV radiation on four freshwater invertebrates. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n. 5, p. 652-659, 2000.

DAHMS, H. U.; LEE, J. S. UV radiation in marine ectotherms: molecular effects and responses. **Aquatic Toxicology**, v. 97, n. 1, p. 3-14, 2010.

DIDERICH, K.; ALANAZI, M.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. **DNA Repair**, v. 10, n. 7, p. 772-780, 2011.

DIFFEY, B. L. Ultraviolet radiation physics and the skin. **Physics in Medicine and Biology**, v. 25, n. 3, p. 405-426, 1980.

DIFFEY, B. L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. **Physics in Medicine and Biology**, v. 36, n. 3, p. 299, 1991.

DIFFEY, B. L. What is light? **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 18, n. 2, p. 68-74, 2002.

DIFFEY, B. L. et al. Modelling vitamin D status due to oral intake and sun exposure in an adult British population. **British Journal of Nutrition**, v. 23, p. 1-9, 2013.

DONG, Q. et al. Photobiological effects of UVA and UVB light in *Zebrafish* embryos: evidence for a competent photorepair system. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, n. 2, p. 137-146, 2007.

D'ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 2013.

DUGGER, D. M.; DOBKIN, S. A contribution to knowledge of the larval development of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v. 29, n. 1, p. 1-30, 1975.

DUPONT, E.; GOMEZ, J.; BILODEAU, D. Beyond UV radiation: A skin under challenge. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, p. 224-232, 2013.

EPEL, D. Protection of DNA during early development: adaptations and evolutionary consequences. **Evolution & development**, v. 5, n. 1, p. 83-88, 2003.

EPEL, D. et al. Development in the floating world: defenses of eggs and embryos against damage from UV radiation. **American Zoologist**, v. 39, n. 2, p. 271-278, 1999.

ESSEN, L. O.; KLAR, T. Light-driven DNA repair by photolyases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 11, p. 1266-1277, 2006.

ESSERS, J. et al. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 21, p. 9350-9359, 2005.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, n. 6, p. 479-517, 2005.

FARMAN, J. C.; GARDINER, B. G.; SHANKLIN, J. D. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. **Nature**, v. 315, p. 207-210, 1985.

FRANCO, R. et al. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1, p. 3-22, 2009.

FREERE, R. H.; WEIBEL, E. R. Stereologic techniques in microscopy. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 87, n. 1, p. 25-34, 1967.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 436-440, 2003.

FROMME, J. C.; VERDINE, G. L. Base excision repair. **Advances in Protein Chemistry**, v. 69, p. 1-41, 2004.

FUKUNISHI, Y. et al. Effect of sub-lethal exposure to ultraviolet radiation on the escape performance of Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). **Plos One**, v. 7, n. 4, p. e35554, 2012.

GALLAGHER, R. P.; LEE, Tim K. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 119-131, 2006.

GODAR, D. E. et al. Solar UV doses of young Americans and vitamin D3 production. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 1, p. 139, 2012.

GOODSELL, D. S. The molecular perspective: ultraviolet light and pyrimidine dimers. **The Oncologist**, v. 6, n. 3, p. 298-299, 2001.

GOUVEIA, G. R. et al. Antioxidant defenses and DNA damage induced by UV-A and UV-B radiation in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 2, p. 398-403, 2005.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-43, 2007.

GROFF, A. A. et al. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 99, n. 2, p. 93-99, 2010.

HÄDER, D. P. et al. Effects on aquatic ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 46, n. 1, p. 53-68, 1998.

HÄDER, D. P. et al. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 39-50, 2003.

HÄDER, D. P. et al. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 267-285, 2007.

HÄDER, D. P.; SINHA, R. P. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1, p. 221-233, 2005.

HAIL, N.; CARTER, B. Z.; KONOPLEVA, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11, n. 6, p. 889-904, 2006.

HÄKKINEN, J.; PASANEN, S.; KUKKONEN, J. V. K. The effects of solar UV-B radiation on embryonic mortality and development in three boreal anurans (*Rana temporaria*, *Rana arvalis* and *Bufo bufo*). **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 441-446, 2001.

HOLTHUIS, L. B. et al. **FAO Species Catalogue Vol. 1. Shrimps and Prawns of the World: An Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries**, FAO Fisheries Synopsis, 1980.

ISELY, N. et al. Expression of the DNA repair enzyme, photolyase, in developmental tissues and larvae, and in response to ambient UV-R in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1168-1176, 2009.

JOKINEN, I. E. et al. Additive effects of enhanced ambient ultraviolet B radiation and increased temperature on immune function, growth and physiological condition of juvenile (parr) Atlantic Salmon, *Salmo salar*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 102-108, 2011.

KARENTZ, D. Ozone Layer. **Encyclopedia of Ecology**. v. 3, n. 1, p. 2615-2621, 2008.

KAUFMANN, W. K.; PAULES, R. S. DNA damage and cell cycle checkpoints. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 2, p. 238-247, 1996.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239, 1972.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, n. 1, p. 27-45, 2002.

KIM, R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. **Cancer**, v. 103, n. 8, p. 1551-1560, 2005.

KIM, R. O. et al. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, *Brachionus* sp. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 3, p. 529-539, 2011.

KIENZLER, A.; BONY, S.; DEVAUX, A. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: a review. **Aquatic Toxicology**, v. 135, p.47-56, 2013.

KIRCHHOFF, V. W. J. H. et al. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. **Brazilian Journal of Geophysics**, v. 18, n. 1, p. 63-74, 2000.

KIRCHHOFF, V. W. J. H. et al. Evidence for an ozone hole perturbation at 30 south. **Atmospheric Environment**, v. 30, n. 9, p. 1481-1488, 1996.

LAGERWERF, S. et al. DNA damage response and transcription. **DNA Repair**, v. 10, n. 7, p. 743-750, 2011.

LAND, M. F.; NILSSON, D. E. **Animal Eyes**. Oxford University Press, 2012.

LESSER, M. P.; BARRY, T. M. Survivorship, development, and DNA damage in echinoderm embryos and larvae exposed to ultraviolet radiation (290–400 nm). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 292, n. 1, p. 75-91, 2003.

LESSER, M. P.; FARRELL, J. H.; WALKER, C. W. Oxidative stress, DNA damage and p53 expression in the larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290–400 nm) radiation. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 1, p. 157-164, 2001.

LESSER, M. P.; KRUSE, V. A.; BARRY, T. M. Exposure to ultraviolet radiation causes apoptosis in developing sea urchin embryos. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 22, p. 4097-4103, 2003.

LO, H. L. et al. Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. **BMC Cancer**, v. 5, n. 1, p. 135, 2005.

MAHMOUD, B. H. et al. Effects of visible light on the skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 2, p. 450-462, 2008.

MAHMOUD, U. M.; MEKKAWY, I. A. A.; SAYED, A. E. H. Ultraviolet radiation-A (366nm) induced morphological and histological malformations during embryogenesis of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, n. 2, p. 117-128, 2009.

MACFADYEN, E. J. et al. Molecular response to climate change: temperature dependence of UV-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulex*. **Global Change Biology**, v. 10, n. 4, p. 408-416, 2004.

MAIONE, M. et al. Ten years of continuous observations of stratospheric ozone depleting gases at Monte Cimone (Italy) - Comments on the effectiveness of the Montreal Protocol from a regional perspective. **Science of The Total Environment**, v. 445, p. 155-164, 2013.

MEADOR, J. et al. Seasonal fluctuation of DNA photodamage in marine plankton assemblages at Palmer Station, Antarctica. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 3, p. 266-271, 2002.

MELO, S. G.; BROSSI-GARCIA, A. L. Desenvolvimento larval de *Macrobrachium birai* Lobão, Melo & Fernandes (Crustacea, Decapoda, Caridea, Palaemonidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 1, p. 131-152, 2005.

MIGUEL, N. C. O.; MEYER-ROCHOW, V. B.; ALLODI, S. Ultrastructural study of first and second order neurons in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. **Micron**, v. 33, n. 7, p. 627-637, 2002.

MIGUEL, N. C. O. et al. Catalase, Bax and p53 expression in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 1, p. 159-168, 2007.

MIRZAYANS, R. et al. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-16, 2012.

MITCHELL, D. L.; FERNANDEZ, A. A. Different types of DNA damage play different roles in the etiology of sunlight-induced melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 1, p. 119-124, 2011.

MOLINA, M. J., ROWLAND, F. S. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalyzed destruction of ozone. **Nature**, v. 249, p. 810-812, 1974.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 263-269, 2009.

MORESINO, R. D. H.; GONÇALVES, R. J.; HELBLING, E. W. Sublethal effects of ultraviolet radiation on crab larvae of *Cyrtograpsus altimanus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 407, n. 2, p. 363-369, 2011.

MOSSOLIN, E. C.; BUENO, S. L. S. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 2, p. 367-376, 2002.

MÜLLER, Y. M. R. et al. Biology of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) from the Ratoes Hidrografic Basin, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 629-636, 1999.

MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M.; SIMÕES-COSTA, M. S. Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, n. 4, p. 869-875, 2003.

MÜLLER, Y. M. R.; PRAZERES, A. C. Influência da salinidade e temperatura da água sobre a captura de *Macrobrachium Olfersii* (WIEGMANN, 1836) coletados no canal da Lagoa do Peri. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 175, p. 183, 1992.

NAGANUMA, T.; INOUE, T.; UYE, S. Photoreactivation of UV-induced damage to embryos of a planktonic copepod. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 6, p. 783-787, 1997.

NAHON, S. et al. Sensitivity to UV radiation in early life stages of the Mediterranean sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 1892-1900, 2009.

NASSER, N. UVB: susceptibility in malignant melanoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 6, p. 843-848, 2010.

NAZARI, E. M. et al. Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 1, p. 25-33, 2010.

NAZARI, E. M., AMMAR, D., MÜLLER, Y. M. R., ALLODI, S. Impacts of ultraviolet-B radiation on aquatic embryos. *In* Exploring themes on aquatic toxicology. **Research Signpost**, v. 1, p. 103-118, 2013.

NAZARI, E. M. et al. Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiana* and

Macrobrachium olfersi (Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, n. 4, p. 862-868, 2003.

NINOV, N.; MANJÓN, C.; MARTÍN-BLANCO, E. Dynamic control of cell cycle and growth coupling by ecdysone, EGFR, and PI3K signaling in *Drosophila* histoblasts. **Plos Biology**, v. 7, n. 4, p. 892-903, 2009.

PANDELOVA, I. et al. UVB Dose-toxicity thresholds and steady-state DNA-photoproduct levels during chronic irradiation of inbred *Xenopus laevis* tadpoles. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 4, p. 1080-1087, 2006.

PAUL, N. D.; GWYNN-JONES, D. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 1, p. 48-55, 2003.

PEI, S.; STRAUSS, P. R. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 744, p.151-159, 2012.

PIETENPOL, J. A.; STEWART, Z. A. Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, v. 181, p. 475-481, 2002.

PRZESLAWSKI, R. Combined effects of solar radiation and desiccation on the mortality and development of encapsulated embryos of rocky shore gastropods. **Marine Ecology: Progress Series**, v. 298, p. 169-177, 2005.

PRZESLAWSKI, R.; DAVIS, A. R.; BENKENDORFF, K. Synergistic effects associated with climate change and the development of rocky shore molluscs. **Global Change Biology**, v. 11, n. 3, p. 515-522, 2005.

RENZING, J.; HANSEN, S.; LANE, D. P. Oxidative stress is involved in the UV activation of p53. **Journal of Cell Science**, v. 109, n. 5, p. 1105-1112, 1996.

RIVA, F. et al. UV-induced DNA incision and proliferating cell nuclear antigen recruitment to repair sites occur independently of p53–replication protein A interaction in p53 wild type and mutant ovarian carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 12, p. 1971-1978, 2001.

ROWLAND, F. S. Stratospheric ozone depletion. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1469, p. 769-790, 2006.

SANCAR, A. Structure and function of DNA photolyase. **Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 2-9, 1994.

SANCAR, A. DNA excision repair. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 43-81, 1996.

SANCAR, A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 6, p. 2203-2238, 2003.

SCHLEICH, K.; LAVRIK, I. N. Mathematical modeling of apoptosis. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2013.

SCHOLTZ, G.; PATEL, N. H.; DOHLE, W. Serially homologous engrailed stripes are generated via different cell lineages in the germ band of amphipod crustaceans (Malacostraca, Peracarida). **The International Journal of Developmental Biology**, v. 38, n. 3, p. 471-478, 1994.

SHANKLIN, J. Reflections on the ozone hole. **Nature**, v. 465, n. 7294, p. 34-35, 2010.

SIMÕES-COSTA, M. S. et al. Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman)(Crustacea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, p. 501-508, 2005.

SINHA, R. P.; HÄDER, D. P. UV-induced DNA damage and repair: a review. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 225-236, 2002.

SMITH, M. A.; BERRILL, M.; KAPRON, C. M. Photolyase activity of the embryo and the ultraviolet absorbance of embryo jelly for several Ontario amphibian species. **Canadian Journal of Zoology**, v. 80, n. 6, p. 1109-1116, 2002.

STATE UNIVERSITY OF NEW YORK. **Science of the Ozone Layer**. Disponível em <www.albany.edu/faculty/rgk/atm101/ozone.htm>. Acesso em: 08 julho 2013.

SUZANNE, M.; STELLER, H. Shaping organisms with apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 5, p. 669-675, 2013.

THOMA, F. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 23, p. 6585-6598, 1999.

THOMPSON, C. L.; SANCAR, A. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. **Oncogene**, v. 21, n. 58, p. 9043, 2002.

TODO, T. et al. Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4) photolyase. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 4, p. 764-768, 1997.

TODO, T. et al. Similarity among the *Drosophila* (6-4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 109-112, 1996.

UCHIDA, N. et al. Photoreactivating enzyme for (6-4) photoproducts in cultured *Goldfish* cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, n. 6, p. 964-968, 1997.

UNIVERSITY OF TEXAS AT EL PASO. **DNA Repair: Photoreactivation**. Disponível em: <utminers.utep.edu/rwebb/html/dna_repair__photoreactivation.html>. Acesso em: 20 julho 2013.

VARGAS, M. A. et al. Influence of the dark/light rhythm on the effects of UV radiation in the eyestalk of the crab *Neohelice granulata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 343-350, 2010.

VEHNIÄINEN, E. R.; VÄHÄKANGAS, K.; OIKARI, A. UV-B Exposure causes DNA damage and changes in protein expression in Northern pike (*Esox lucius*) posthatched embryos. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 2, p. 363-370, 2012.

VERMEULEN, W. Dynamics of mammalian NER proteins. **DNA Repair**, v. 10, n. 7, p. 760-771, 2011.

VERNET, M. Enhanced UV-B radiation in natural ecosystems as an added perturbation due to ozone depletion. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 4, p. 831-833, 2006.

WALTER, T. B. **Ozone Depletion**. Disponível em <www.geography.hunter.cuny.edu/tbw/wc.notes/1.atmosphere/ozone_depletion.1.htm>. Acesso em: 08 julho 2013.

WEBB, A. R.; HOLICK, M. F. The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. **Annual Review of Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 375-399, 1988.

WILLIAMSON, C. E. et al. Temperature-dependent ultraviolet responses in zooplankton: implications of climate change. **Limnology and Oceanography**, v. 47, n. 6, p. 1844-1848, 2002.

YANG, W. Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions. **Protein Science**, v. 20, n. 11, p. 1781-1789, 2011.

YASUI, A.; MCCREADY, S. J. Alternative repair pathways for UV-induced DNA damage. **Bioessays**, v. 20, n. 4, p. 291-297, 1998.

YU, J.; YANG, G.; TIAN, J. Effects of UV-B radiation on ingestion, fecundity, population dynamics and antioxidant enzyme activities of *Schmackeria inopinus* (Copepoda Calanoida). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 381, n. 2, p. 74-81, 2009.

ZENG, Z. et al. Zebrafish have a competent p53-dependent nucleotide excision repair pathway to resolve ultraviolet B-induced DNA damage in the skin. **Zebrafish**, v. 6, n. 4, p. 405-415, 2009.

APÊNDICE A – Padronização da fixação dos ovos

Para a confecção de cortes no criostato, os ovos foram submetidos a três procedimentos de fixação, os quais foram precedidos ou não da etapa de descorionização dos ovos com hipoclorito de sódio a 5%, por 5 minutos.

- fixação com solução de heptano-FA

Os ovos foram fixados em solução de heptano-FA (tampão PBS 10 mM, pH 7,4 + EGTA 0,05 mM + formaldeído a 37% + heptano PA) por 10 minutos em agitação e lavados por 30 segundos com metanol PA, e após preservados em etanol 100% a 4°C.

- fixação com paraformaldeído

Os ovos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% por diferentes tempos (6, 8, 12, 20 e 24 horas) à temperatura ambiente. Após a fixação, os ovos foram preservados em PBS 1M a 4°C. O tempo adequado para a fixação com paraformaldeído foi 20 horas.

- fixação com solução PEM-FA

Os ovos retirados das fêmeas foram imediatamente fixados em solução PEM-FA (tampão PIPES 0,1M (pH 6,9) + EGTA 2,0 mM + MgSO₄ 1,0 mM + formaldeído 3,7%) (SCHOLTZ et al., 1994) por diferentes tempos (15, 30 e 45 minutos) à temperatura ambiente. Após, os ovos foram mantidos em tampão PBS 1M, pH 7,4 a 4°C. O tempo adequado para a fixação com este fixador foi de 30 minutos, mantendo a integridade do tecido/células após o corte.